

**EVALUACIÓN Y ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LEVADURAS
NATIVAS TIPO *Saccharomyces* spp. A NIVEL DE LABORATORIO.**

LAURA PATRICIA DURANGO LONDOÑO

**UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
MEDELLIN
2007**

**EVALUACIÓN Y ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LEVADURAS
NATIVAS TIPO *Saccharomyces* spp. A NIVEL DE LABORATORIO.**

LAURA PATRICIA DURANGO LONDOÑO

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos**

Asesor

MRes. Valeska Villegas

Ingeniero Químico MSc. Biotecnología

Universidad EAFIT

Co-asesor: MSc. Fredy O. Carvajal

Ingeniero Químico MSc. Biotecnología

Coordinador Área de Investigación y Desarrollo en Biotecnología

ALQUERÍA S.A.

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLIN

2007

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Jurado

Ciudad y Fecha

A Dios por ser la fuerza que me impulsó a seguir día a día y me permitió vivir en condiciones privilegiadas.

A mi papá por ser el motor incansable de todos mis sueños, me has dado tanto que ni una vida eterna me alcanzará para agradecerte.

A mi mamá por ser mi mayor tesoro y la balanza perfecta en todas las situaciones de mi vida, sin ella no sería lo que hoy soy.

A mis hermanitas por ser mi esperanza y mi fuerza para seguir adelante.

A todos los que creyeron en mí y me brindaron su apoyo incondicional, y a los que no creyeron porque me ayudaron a descubrirme.

Al proyecto mismo por enseñarme tanto y resucitar una y otra vez de las cenizas como el ave fénix.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a todas las personas que colaboraron en la realización del proyecto:

Ana Lucía Llano Arango. Ingeniera de Procesos, Universidad EAFIT.

Valeska Villegas. Ingeniera Químico MSc. Biotecnología. Coordinadora del Departamento de Biotecnología y Profesora Universidad EAFIT.

Personal de laboratorios de Ingeniería de Procesos, Edgar Arbeláez, John Estrada y especialmente Sigifredo Cárdenas, auxiliar del laboratorio de Biotecnología Universidad EAFIT.

Edelberto Silva. Químico Farmacéutico. Profesor Departamento de Química Farmacéutica y coordinador del laboratorio de Investigaciones en Microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional sede Bogotá.

Patricia Manovacía y Angélica Moreno. Ingenieras Químicas, Universidad de América, Bogotá. Jóvenes investigadoras del programa de fisiología y nutrición animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

Fernando Rodríguez. Máster en Biología de la Universidad de los Andes y PhD en Microbiología de *Iowa State University*. Director del Laboratorio de Microbiología Molecular de CORPOICA.

Fredy O. Carvajal. Ingeniero Químico. MSc. Biotecnología, Jefe del Departamento de Biotecnología, Productos Naturales de la Sabana S.A. ALQUERIA.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. OBJETIVOS	23
1.1 OBJETIVO GENERAL	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. MARCO TEÓRICO	24
2.1 MICROORGANISMOS RUMINALES	24
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.2.1 Metabolismo	29
2.2.2 Uso de levaduras en alimentación animal	30
2.3 FERMENTACIÓN DE LEVADURAS	31
2.3.1 Producción industrial de levaduras	33
2.3.2 Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.3.2.1 Temperatura	38
2.3.2.2 pH	38
2.3.2.3 Aireación y Agitación	39
2.3.2.4 Medio de cultivo	40
2.4 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE BIOMASA	42
2.5 ESCALAMIENTO DE FERMENTACIONES	45
2.6 CONDICIONES Y CRITERIOS DE ESCALAMIENTO	48
2.6.1 Transferencia de masa	49
2.6.1.1 Determinación de la transferencia de oxígeno	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.1 UBICACIÓN	54

3.2 MICROORGANISMO	54
--------------------	----

Pág.

3.3 MATERIALES	55
3.3.1 Medios de cultivo	55
3.3.2 Activación de la cepa	56
3.3.3 Preparación del pre-inóculo e inóculo	56
3.3.4 Biotransformaciones	57
3.3.4.1 Fermentaciones Preliminares	57
3.3.4.1.1 Condiciones de operación	57
3.3.4.1.2 Toma de muestras	58
3.3.4.2 Fermentaciones en Frascos Agitados	59
3.3.4.2.1 Condiciones de operación	59
3.3.4.2.2 Toma de Muestras	60
3.3.4.3 Fermentaciones en Biorreactor	60
3.3.4.3.1 Condiciones de operación	61
3.3.4.3.2 Toma de muestras	61
3.4 DISEÑO METODOLÓGICO	62
3.4.1 Análisis estadístico	63
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	64
3.5.1 Concentración celular por conteo	64
3.5.2 Determinación de biomasa	64
3.5.3 Cuantificación de consumo de sustrato	65
3.6 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS	65
3.6.1 Máxima velocidad de crecimiento específica	65
3.6.2 Rendimientos observados	65
3.7 ESCALAMIENTO	66
3.7.1 Desde frascos agitados hasta Biorreactor	66
3.7.2 Biorreactores	66
3.7.2.1 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa	

$(k_L a)$

67

Pág.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
4.1 BIOTRANSFORMACIONES	68
4.1.1 Fermentaciones preliminares	68
4.1.2 Fermentaciones en frascos agitados.	71
4.1.2.1 Producción de biomasa y Consumo de sustrato	72
4.1.2.2 Comportamiento del pH	81
4.1.2.3 Parámetros cinéticos	82
4.1.3 Fermentaciones en Biorreactor	89
4.2 ESCALAMIENTO DEL PROCESO	91
4.2.1 Desde frascos agitados hasta Biorreactor	91
4.2.2 Biorreactores	94
4.2.2.1 Determinación de los parámetros de escalado	95
5. CONCLUSIONES	101
6. RECOMENDACIONES	104
BIBLIOGRAFÍA	106
CIBERGRAFÍA	115
ANEXOS	117

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Productos de levadura para uso en alimentación animal, disponibles en el mercado	34
Tabla 2. Requerimientos nutrimentales para los medios de cultivo	41
Tabla 3. Diseño de experimentos para la evaluación en agitadores Orbitales	62
Tabla 4. Análisis de Varianza para el mejor medio de cultivo	71
Tabla 5. Promedio de la fase estacionaria de las fermentaciones que presentaron la mayor producción de biomasa en cada ensayo	75
Tabla 6. Análisis de varianza para la Producción de Biomasa	76
Tabla 7. Medias y error estándar para la producción de biomasa con un intervalo de confianza del 95%	78
Tabla 8. Análisis de varianza para $Y' \frac{x}{s}$	85
Tabla 9. Análisis de varianza para μ_{\max}	85
Tabla 10. Datos obtenidos de las fermentaciones en frascos agitados para determinar el $k_L a$ a partir de la ecuación desarrollada por Maier <i>et al.</i> (2001)	93

	Pág.
Tabla 11. Datos de operación y diseño del biorreactor de V=2 L	96
Tabla 12. Propiedades del medio de cultivo para	96
Tabla 13. Datos de diseño de los biorreactores de 50 L y 100 L	97
Tabla 14. Cálculos para realizar el escalamiento de los biorreactores	98
Tabla 15. Parámetros de operación de los biorreactores	100
Tabla 16. Curvas de crecimiento y consumo de sustrato con sus respectivos errores estándar para determinar el tiempo de cultivo	124
Tabla 17. Determinación del mejor medio de cultivo para el crecimiento de la levadura nativa, <i>Saccharomyces</i> spp, con respecto a la producción de biomasa	125
Tabla 18. Medias y error estándar para la biomasa determinada por el método del peso seco para tres medios de cultivo evaluados, con un intervalo de confianza del 95%	125
Tabla 19. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman- Keuls para los medios de cultivo evaluados	126
Tabla 20. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y pHs con sus respectivos errores estándar e las fermentaciones realizadas en frascos agitados a 100 RPM	127

Tabla 21. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y pHs con sus respectivos errores estándar e las fermentaciones realizadas en frascos agitados a 150 RPM	128
Tabla 22. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y pHs con sus respectivos errores estándar e las fermentaciones realizadas en frascos agitados a 200 RPM	129
Tabla 23. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para la biomasa con respecto al pH	130
Tabla 24. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para la biomasa con respecto a las revoluciones	130
Tabla 25. Rendimiento observado y máxima velocidad de crecimiento específica para las fermentaciones que presentaron la mayor producción de biomasa en cada ensayo	131
Tabla 26. Medias y error estándar para la los rendimientos observados con un intervalo de confianza del 95%	132
Tabla 27. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para los rendimientos observados con respecto al pH	132
Tabla 28. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para los rendimientos observados con respecto a las revoluciones	133

Tabla 29. Medias y error estándar para la velocidad específica de crecimiento máxima μ_{\max} con un intervalo de confianza del 95%	133
Tabla 30. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para la velocidad específica de crecimiento máxima μ_{\max} con respecto al pH	134
Tabla 31. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para la velocidad específica de crecimiento máxima μ_{\max} con respecto a las revoluciones	134
Tabla 32. Producción de biomasa, consumo de sustrato y comportamiento del pH en biorreactor con 2 L de volumen de trabajo, pH 4, 150 RPM, 1vvm y 28°C	135
Tabla 33. Producción de biomasa, consumo de sustrato y comportamiento del pH en biorreactor con 2 L de volumen de trabajo, pH 4, 200 RPM, 1vvm y 28°C	135

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura y organelos de una célula de levadura	28
Figura 2. Metabolismo de la levadura bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas	30
Figura 3. Curva de crecimiento de los microorganismos	43
Figura 4. Transporte de oxígeno de una burbuja de gas hasta el interior de la célula	50
Figura 5. Fotografía de la cepa de levadura <i>Saccharomyces</i> spp. en medio YM sólido después de 48 h de incubación (cultivo de reserva)	56
Figura 6. Montaje de las fermentaciones en frascos agitados	59
Figura 7. Biorreactor BIOENGINEERING CH 8636	60
Figura 8. Curvas de crecimiento preliminares para <i>Saccharomyces</i> spp. en medio YM modificado con melaza	69
Figura 9. Evaluación de los medios de cultivo para el crecimiento de la levadura nativa, <i>Saccharomyces</i> spp., por las técnicas de peso seco y conteo en cámara de Neubauer	70

	Pág.
Figura 10. Producción de biomasa y consumo de sustrato (A) 100 RPM, (B) 150 RPM y (C) 200 RPM	73
Figura 11. Interacciones entre el pH y las RPM teniendo como variable de respuesta la producción de biomasa	77
Figura 12. Comportamiento del pH durante las fermentaciones (A) 100 RPM, (B) 150 RPM, (C) 200 RPM	81
Figura 13. Parámetros cinéticos para las fermentaciones (A) 100 RPM, (B) 150 RPM, (C) 200 RPM	83
Figura 14. Interacciones entre el pH y las RPM teniendo como variable de respuesta $Y' \frac{x}{s}$	86
Figura 15. Interacciones entre el pH y las RPM teniendo como variable de respuesta μ_{\max}	87
Figura 16. Producción de biomasa y consumo de sustrato en biorreactor de 2 L de trabajo, pH 4, 150 RPM, 1vvm y 28°C	90
Figura 17. Producción de biomasa y consumo de sustrato en biorreactor de 2 L de trabajo, pH 4, 200 RPM, 1vvm y 28°C	91
Figura 18. Caracterización de biorreactor BIOENGINEERING CH 8636	94
Figura 19. Nomenclatura y dimensiones para un tanque agitado	97

Figura 20. Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo para el método dinámico de eliminación de gas para la determinación de $k_L a$. La aireación se suspende en el punto A y se reanuda en el punto B	120
Figura 21. Método dinámico para la eliminación de gas para la determinación de $k_L a$	122
Figura 22. Relación entre el número de Reynolds y tres tipos de impulsores	136

LISTA DE ECUACIONES

	Pág.
1. Correlación entre la velocidad de crecimiento específico y la concentración celular	44
2. Ecuación de Monod	44
3. Transferencia de oxígeno	50
4. Demanda de oxígeno	51
5. Concentración celular por el método de cámara de Neubauer	64
6. Rendimiento observado para la biomasa en el sustrato ($Y'_{x/s}$)	65
7. Transferencia de oxígeno máxima	92
8. Transferencia de oxígeno	92
9. Calculo del $k_L a$ desde frascos agitados hasta Biorreactor	93
10. Correlación de Van't Riet para calcular el $k_L a$ entre biorreactores	95
11. Relación de volúmenes y concentraciones.	115
12. Concentración celular (g/L)	116

Pág.

13. Toma del oxígeno disuelto por las células 121

14. Concentración de aire disuelto en el seno del fluido 121

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Curva de calibración para la determinación de la cantidad de biomasa (peso seco vs. Densidad óptica) y Determinación de biomasa	117
ANEXO B. Preparación del DNS, curva de calibración y determinación de azúcares reductores por el método del DNS	119
ANEXO C. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno por el método dinámico de eliminación de gas	120
ANEXO D. Fermentaciones preliminares	124
ANEXO E. Fermentaciones en frascos agitados	127
ANEXO F. Parámetros cinéticos	131
ANEXO G. Fermentaciones en biorreactor	135
ANEXO H. Relación entre el número de Reynolds y tres tipos de impulsores	136

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la variación de dos parámetros críticos del proceso de producción de biomasa de *Saccharomyces* spp. como el pH (4, 5 y 5.5) y la agitación (100, 150 y 200 RPM), con el fin de determinar cuáles eran las mejores condiciones que permitieran obtener la máxima concentración de biomasa. Las fermentaciones batch se llevaron a cabo a escala de laboratorio en frascos agitados con medio YM modificado con melaza (Manovacía y Moreno, 2005). El microorganismo utilizado fue una cepa nativa de levaduras tipo *Saccharomyces* spp. perteneciente al banco de germoplasma de microorganismos con interés en control biológico de CORPOICA (Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca) y que fue donado a la empresa ALQUERIA S.A para el desarrollo de un proyecto de innovación tecnológica.

A Las mejores condiciones del proceso para una máxima producción de biomasa se, obtuvo una concentración de 19,9 g/L con un rendimiento observado de sustrato en biomasa de 0,463 gr biomasa/ gr sustrato y una velocidad máxima de crecimiento específico de $0,314\text{ h}^{-1}$ a las 12 horas.

El sistema se escaló experimentalmente a un biorreactor, con un volumen de trabajo de 2 L, tomando como criterio de escalamiento el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $k_L a$, debido a que el suministro de oxígeno es un factor determinante en el proceso. Esta información sirvió para realizar un escalamiento conceptual del proceso hasta un volumen de 100 L.

Palabras Claves: fermentaciones en frascos agitados, *Saccharomyces* spp., escalamiento, fermentaciones en biorreactor.

INTRODUCCIÓN

La levadura del pan es uno de los productos más antiguos de la industria de las fermentaciones y para su fabricación es necesario llevar a cabo un proceso fermentativo aeróbico que depende fuertemente de la transferencia de oxígeno y nutrientes al microorganismo (Parakulsuksatid, 2000). Durante los últimos años, este microorganismo ha presentado características especiales que han permitido desarrollar otro tipo de productos con diferentes funciones y dirigida para sectores completamente heterogéneos. Uno de estos casos es el sector ganadero, donde se ha encontrado que existe un gran potencial en productos basados en microorganismos de origen ruminal y por lo tanto se han formulado numerosos productos principalmente de cultivos de levaduras como una alternativa a los problemas que se presentan con respecto a las deficiencias en productividad y competitividad del sector. Gracias a la biotecnología y la industria de las fermentaciones ha surgido una nueva tecnología que muestra beneficios en los animales como incremento en la ganancia de peso, en la producción de leche y en la digestibilidad total de los componentes de la dieta mediante el suministro directo de microorganismos (Lee *et al.*, 2004).

Sobre estos antecedentes, los Laboratorios de Microbiología Molecular y de Química de CORPOICA han realizado numerosos estudios de los diferentes microorganismos presentes en el rumen de los bovinos, con el fin de buscar posibles aplicaciones enfocadas al mejoramiento del funcionamiento ruminal. Entre todos los microorganismos ruminales se ha prestado especial atención a las levaduras. De un grupo de 100 cepas provenientes de diferente origen, se realizó una selección de 5 cepas de alto desempeño, las cuales mostraron diferencias significativas en parámetros de fermentación ruminal como: la producción de biomasa, selenio microbiano, carbohidratos totales microbianos, proteína microbiana, relación ácido acético/ ácido propiónico y la energía potencial neta de lactancia, factores

relacionados directamente con la producción de leche y que pueden aprovecharse para la formulación de un producto de alta calidad, dirigido a sistemas de producción intensiva de leche que permita estimular el establecimiento de cepas altamente fibrolíticas en el rumen para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal, la ganancia de peso y la productividad en carne y leche, como lo plantearon Anderson *et al.*, (1987) y Beharka *et al.*, (1998).

Aunque existen algunos casos de escalamiento a nivel industrial de productos microbianos, no se conocen en Colombia procesos de producción de suplementos microbianos destinados a la nutrición animal. El escalamiento de este tipo de productos, se debe realizar en un orden consecutivo desde condiciones de laboratorio hasta la producción en biorreactor a nivel de laboratorio, banco, piloto e industrial.

La optimización de la producción de levaduras está basada no solo en la selección de la cepa, sino también en el mejoramiento de las condiciones medioambientales del cultivo como la temperatura, pH, agitación, aireación y concentración de nutrientes, punto en el cual el uso de frascos agitados se constituye en una herramienta útil para el desarrollo de bioprocesos ya que es posible llevar a cabo diferentes experimentos simultáneamente con un gasto de materiales mínimo. Adicionalmente, en esta etapa es posible buscar nuevos productos, estudiar mecanismos de control, mejorar las cepas de producción y ajustar las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo, para posteriormente pasar a la siguiente escala de manera que se garantice la permanencia de las condiciones óptimas de operación y para que sea posible conocer las respuestas del sistema a las diferentes perturbaciones a las que sea sometido, para poder controlar y tomar decisiones sobre el proceso.

El desarrollo de este proyecto de grado que se realizó con una cepa de levadura nativa *Saccharomyces* spp. suministrada por la empresa ALQUERÍA S.A., consistió en llevar a cabo el escalamiento del proceso con el fin de obtener la mayor cantidad de biomasa posible, tomando como criterio de escalamiento el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$).

Inicialmente se determinaron experimentalmente las mejores condiciones de pH y agitación que satisfacen todas las necesidades del microorganismo permitiendo producir una buena cantidad de biomasa realizando ensayos a escala de laboratorio en frascos agitados con volumen de trabajo de 250 mL para posteriormente escalar y comprobar resultados en fermentador de 2 L. A partir de la información obtenida en biorreactor se realizó un escalamiento conceptual hasta un volumen de 100 L.

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de biomasa de *Saccharomyces* spp, a escala laboratorio, con diferentes condiciones de agitación y pH, y escalar su producción a un reactor de 3 L y 100 L.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1 Evaluar la cinética de crecimiento de *Saccharomyces* spp. a diferentes condiciones de pH y agitación en frascos agitados por métodos gravimétricos y espectrofotométricos con el fin de determinar la mayor concentración celular.

1.2.2 Evaluar la cinética de consumo de sustrato de *Saccharomyces* spp. a diferentes condiciones de pH y agitación en frascos agitados por el método del DNS con el fin de determinar los rendimientos de sustrato en biomasa.

1.2.3 Escalar la producción de biomasa de *Saccharomyces* spp. desde frascos agitados a un biorreactor de 3 L y 100 L por el método del $k_L a$ constante.

2. MARCO TEÓRICO

Los microorganismos ruminales llevan a cabo un complejo proceso de fermentación, esencial para el mantenimiento de la nutrición y digestión del alimento en el animal hospedero (Bryant y Burkey, 1953). En años recientes se ha incrementado en forma considerable la adición de agentes microbianos suplementados en forma directa en la alimentación de vacas lecheras de alta producción gracias a la biotecnología y la industria de las fermentaciones que han hecho posible el desarrollo a gran escala de productos microbianos, basados principalmente en cultivos de levaduras que actúan simultáneamente como probióticos, prebióticos y cofactores (Orpin y Joblin, 1997; Nagaraja *et al.*, 1997).

2.1 MICROORGANISMOS RUMINALES

Desde el punto de vista evolutivo, los rumiantes son considerados como la especie animal de mayor desarrollo en el sistema digestivo. Las adaptaciones anatómicas dieron como resultado la compartimentación del tracto digestivo y las fermentaciones pre-gástricas desarrolladas, condujeron a una relación simbiótica del animal hospedero y su ecosistema microbiano (García, 2004). El rumen es una de estas adaptaciones altamente especializada del tracto digestivo que facilita el almacenamiento y procesamiento de los diferentes nutrientes consumidos en la dieta de las vacas (García, 2004).

La digestión de los forrajes, depende en gran parte de la estructura y composición química de las plantas (Arcos y Díaz, 2004), las cuales poseen en su pared celular carbohidratos estructurales formados principalmente por celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina. Estos compuestos no son digeribles por el animal huésped sino por

los microorganismos que viven en el rumen y en el intestino, siendo así los únicos capaces de digerir las paredes celulares de las plantas (celulosa y hemicelulosa) para producir azúcares simples (glucosa) y ácidos grasos volátiles (AGV) que cruzan las paredes del rumen y sirven como fuente de energía (Davis, 1993). Estos microorganismos gastrointestinales, pueden además, prevenir infecciones disminuyendo o suprimiendo el crecimiento de poblaciones patógenas en el tracto digestivo (Reid *et al.*, 1990; Sen y Babu, 2004). Cualquier cambio abrupto en la dieta, estrés o terapia antibiótica puede trastornar este balance microbiano, haciendo al hospedero susceptible a enfermedades y provocando una disminución en la eficiencia del uso de la comida (Sen y Babu, 2004).

Las tres grandes poblaciones que predominan en el ecosistema ruminal son las bacterias, los protozoarios y los hongos. Estos microorganismos funcionan de manera sinérgica y competitiva debido a su diversidad, y en simbiosis se adaptan a sobrevivir en condiciones de anaerobiosis, altas diluciones, altas densidades de células y de predación protozoaria (García, 2004).

Las bacterias son los microorganismos más abundantes dentro del ecosistema ruminal, alrededor de 10 billones por mililitro, que representa el 50% de la masa microbiana total del rumen. Se encuentran en gran variedad de géneros y especies (por lo menos 28 especies funcionalmente importantes), las cuales se agrupan de acuerdo a su actividad. La mayoría son anaerobias estrictas, aunque también se encuentran presentes organismos facultativos. Entre sus funciones se encuentra, la degradación de la fibra, la digestión de la pared celular (hemicelulosa, almidones y celulosa), la producción de aminoácidos, la fermentación de azúcares solubles y la producción de ácidos grasos volátiles AGV. Las 3 especies bacterianas celulolíticas predominantes son la *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus* (Mojica, 1993; Mayorga, 2002).

Los protozoarios se encuentran en menor proporción que las bacterias aunque tienen un mayor volumen individual. Estos microorganismos no son indispensables en el desarrollo y funcionamiento metabólico, pero pueden tener efectos en la productividad final del hospedero. Son importantes en la digestión de carbohidratos y proteínas. Además, contribuyen con la producción de AGV's y tienen control sobre su rata de producción. Se ha comprobado que algunos de los protozoos que tienen presencia en el rumen incluyen los géneros *Eudiplodinium*, *Polypylstron*, *Epidinium*, *Entodinium* e *Isotricha* (Mojica, 1993; Mayorga, 2002).

Los hongos ruminales anaeróbicos (HAR) están directamente relacionados con el contenido en la fibra de la dieta, y su proporción disminuye en raciones ricas en almidón o azúcares solubles. Están asociados con la colonización, debilitamiento y reducción de tamaño de las partículas fibrosas. Algunas especies como *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces comunis* y *Orpinomyces joyonii* son eficiente en la digestión de polisacáridos estructurales como las especies bacterianas más activamente celulolíticas (Mojica, 1993; Mayorga, 2002).

2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, más conocida como “la levadura de la cerveza” es un hongo ambiental común y es un componente transitorio de las microbiotas digestiva y cutánea humanas. Taxonómicamente pertenece al Phylum *Ascomycota*, a la Clase *Hemiascomycetes*, del Orden *Saccharomycetales* y de la Familia de las *Saccharomycetaceae*. Es un hongo levaduriforme de pared lisa en su interior, que presenta células alargadas, globoides a elipsoidales con gemaciones o blastoconidios multilaterales, ascos con hasta cuatro ascosporas esféricas o elipsoides en un rango de 5 a 10 μm de diámetro externo y de 1 a 7 μm de diámetro interno (Hongos-alergénicos, 2006; Feldmann, 2005).

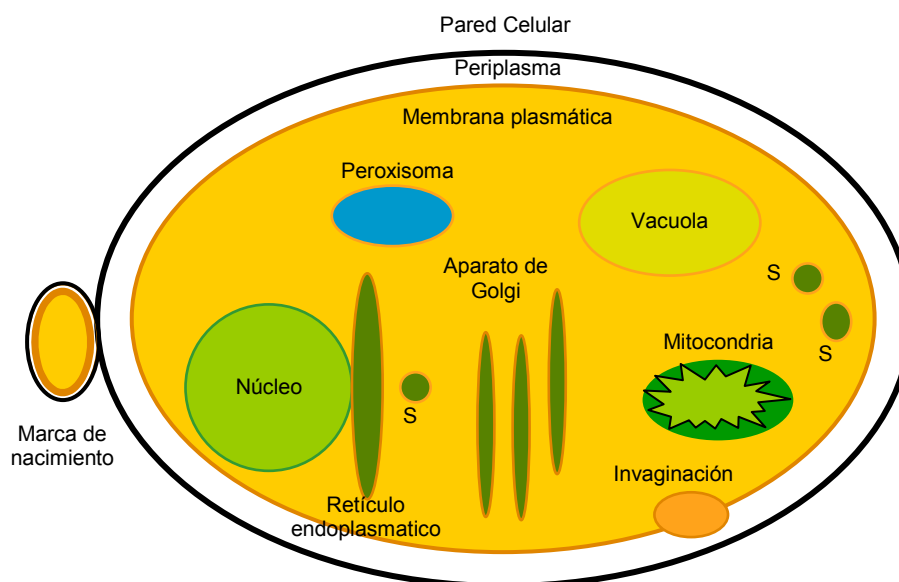
De las levaduras, la especie *S. cerevisiae* es la más estudiada. Durante años ha sido usada para la elaboración de vino, cerveza, pan y en investigación principalmente de aplicaciones industriales y médicas, benéficas para la vida humana. En 1980 fue utilizada para la producción de la vacuna de hepatitis B y en 1996 se convirtió en el primer organismo eucariota al cual pudo establecerse la secuencia genómica completa, convirtiéndose en la referencia de comparación para las secuencias de humanos, genes animales o vegetales y múltiples organismos unicelulares (Feldmann, 2005).

Las levaduras son hongos microscópicos, unicelulares, que presentan diversidad respecto al tamaño celular, forma y color, aun tratándose de células individuales de una misma cepa, debido principalmente a la alteración de las condiciones físicas y químicas en el ambiente. Generalmente son de forma esférica u ovalada y miden entre 5 y 10 micras. Viven en estado aislado hasta que adquieren el tamaño adecuado para dividirse, produciendo células hijas, que a su vez se separan, extienden y dividen de la misma manera. Se consideran como organismos facultativos, lo cual significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno (Guilliermond, 1920; Feldmann, 2005).

En cuanto a su estructura (figura 1), la levadura está compuesta por la envoltura de la célula que incluye la membrana plasmática, un espacio periplásmico y una pared celular; además de citosol, núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático, aparato de golgi, vacuola, vesícula secretora (S) y peroxisoma (Ramírez y Pedroza, 2001; Feldmann, 2005). La pared celular tiene una estructura semirrígida permeable al soluto que proporciona a las levaduras una considerable fuerza compresional y tensil en la cual se desarrollan las marcas de nacimiento durante la división celular; y está constituida principalmente por una pequeña cantidad de péptido y polisacáridos principalmente β -glucanos y mananoligosacáridos (MOS), los cuales tienen impacto en el sistema inmunológico y en la capacidad de prevenir la colonización de

bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal (Ramírez y Pedroza, 2001; Hongos-alergénicos, 2006).

Figura 1. Estructura y organelos de una célula de levadura.



Fuente: Feldmann, 2005

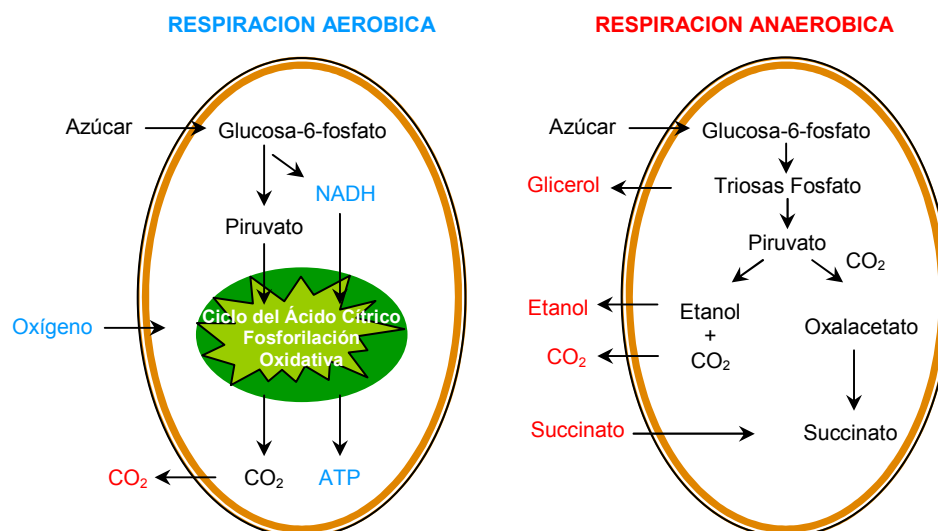
Entre los constituyentes micromoleculares de la levadura, a pesar de que son variables, predominan los hidratos de carbono (polisacáridos) y en menor proporción se encuentran proteínas (glicoproteínas), aunque la levadura seca es una buena fuente de proteína (aproximadamente el 40% del peso de la levadura); grasas (lípidos); polifosfatos y ácidos nucleicos (Feldmann, 2005). Las levaduras proporcionan vitaminas del complejo B (principalmente Tiamina, Riboflavina, Niacina y Ácido Pantoténico), vitamina D (ergosterol), minerales y aminoácidos (niveles sobresalientes de lisina y metionina). Por este alto contenido de nutrientes de alto valor nutricional que se encuentran fácilmente disponibles, las levaduras reúnen características favorables para uso en alimentación animal (Glucos Internacional, 2006).

2.2.1 Metabolismo

La mayoría de levaduras usan azúcares como su principal fuente de carbono y energía. En la producción de levadura *S. cerevisiae* la mayor fuente de energía es la glucosa y la glucólisis es la principal vía para la conversión de la glucosa a piruvato. La producción de energía en forma de ATP es acompañada de la generación de intermediarios y disminución de energía en forma de NADH para las vías biosintéticas. El metabolismo de las levaduras como en los demás organismos, esta mediado por reacciones enzimáticas (Feldmann, 2005).

El uso del piruvato en la generación de energía puede darse mediante la respiración en presencia de oxígeno (aerobiosis), o fermentación en ausencia o represión (anaerobiosis) de oxígeno (figura 2) (Feldmann, 2005). En fermentaciones aeróbicas (anabolismo) el metabolismo de *S. cerevisiae* es igual al de las plantas, se alimenta, respira y se multiplica. Mediante procesos reductivos usa los azúcares para la producción de material celular nuevo, la tasa de transporte del piruvato a la mitocondria es igual al transporte de azúcar a la célula, se produce dióxido de carbono como el mayor metabolito con poca generación de etanol y ocurre una alta tasa de consumo de oxígeno y sustrato. Bajo condiciones anaeróbicas (catabolismo), en cambio, se remueven electrones del sustrato o se usan intermediarios para generar energía, la tasa de consumo de azúcar es mas alta que la tasa de transporte del piruvato a la mitocondria y el metabolismo favorece la producción de etanol y CO₂, con una tasa de consumo limitado de oxígeno y un bajo rendimiento en la producción de biomasa. Estos procesos usan NADP o NAD como cofactores respectivamente (Barford, 1990; Feldmann, 2005; Parakulsuksatid, 2000).

Figura 2. Metabolismo de la levadura bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas



Fuente: Feldmann, 2005.

2.2.2 Uso de levaduras en alimentación animal

Durante los últimos años se ha aumentado de manera considerable el uso de aditivos microbianos que se suplementan en forma directa en sistemas de alimentación animal, formulados principalmente a partir de cepas de bacterias y hongos altamente celulolíticos (García *et al.*, 2004; Arcos y Díaz, 2004). La mayoría de los cultivos de levadura con fines de nutrición animal, se derivan del género *Saccharomyces* y especie *cerevisiae* (Nagaraja *et al.*, 1997). En el ambiente ruminal, las levaduras son capaces de sobrevivir durante cortos periodos de tiempo y aunque se desconocen los factores por los cuales las levaduras pueden crecer, tienen una habilidad limitada para hacerlo (Miller *et al.*, 2002; Bach *et al.*, 2004).

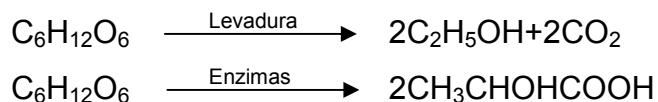
Múltiples estudios se han llevado a acabo (ganado lechero de lactancia temprana, vacas altas productoras, novillos, vacas lecheras en estabulación libre) con el fin de demostrar los beneficios que presenta la suplementación directa de levaduras tipo S.

cerevisiae (Miller *et al.*, 2002; García *et al.*, 2004; Bach *et al.*, 2004). Aunque algunos autores no han encontrado ventajas significativas (Arambel y Kent, 1990) otros han podido determinar una mejora en la ingestión de materia seca y producción diaria de leche (Bach *et al.*, 2004). Además, se ha presentado como una alternativa para la sustitución de los antibióticos empleados como promotores de crecimiento (Lynch y Martin, 2002). La adición del cultivo de *S. cerevisiae* en diferentes sistemas de alimentación de ganado lechero estabiliza y optimiza la función del sistema digestivo bovino. El cultivo actúa por dos vías: una parte de los metabolitos son saborizantes que estimulan el consumo de forraje, mejorando la digestión de la fibra presente en ellos, logrando mayor aporte de energía para mantenimiento y producción; por otro lado, los metabolitos alimentan los microorganismos ruminales, estimulando el metabolismo especialmente de la población celulolítica (Salazar, 2004). Además, se aumenta la producción de AGV's y se altera la relación acetato/propionato (Miller, 2002 *et al.*; Kamalamma *et al.*, 1996) lo que genera un aumento del pH (Miller *et al.*, 2002) que permite reducir el riesgo y la severidad de la acidosis ruminal (Bach *et al.*, 2004). Incrementan la digestión y el flujo de proteína microbiana al duodeno (Kamalamma *et al.*, 1996) proporcionando grandes valores de nutrientes al hospedero, aumentando el aprovechamiento de los pastizales y repercutiendo en un mayor desempeño productivo de carne, leche o ganancia de peso (Salazar, 2004).

2.3 FERMENTACIÓN DE LEVADURAS

La práctica de la fermentación es una de las más viejas tecnologías descubiertas por el hombre. La capacidad fermentable de los microorganismos se ha utilizado por miles de años. Las levaduras fueron utilizadas para elevar el pan en Egipto a partir del 4000 A.C. y los productos lácteos fermentados tales como queso y yogur fueron desarrollados tempranamente en la historia (Scragg, 1991).

Tradicionalmente se definía una fermentación como el proceso de producción de etanol o ácido láctico a partir de glucosa:



El término “fermentación” tiene diversos significados en la práctica y su significado bioquímico se relaciona con la generación de la energía por el catabolismo de compuestos orgánicos, mientras que su significado en microbiología industrial tiende a ser mucho más amplio. A nivel industrial, se ha extendido para describir cualquier proceso químico catalizado por los sistemas microbianos enzimáticos, los cuales se producen durante el crecimiento de los microorganismos (Hensirisak, 1997). Este proceso es esencialmente una serie de reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en un recipiente llamado fermentador o biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y/o biomasa. El microorganismo va aumentando su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman los productos. Estos fenómenos de crecimiento y formación de producto que tienen lugar durante el desarrollo del proceso pueden ocurrir de forma simultánea o independiente (Duarte, 1998).

Los productos de la fermentación, se pueden clasificar en tres grupos generales: Los que reproducen las células microbianas (obtención de las células mismas), los que se generan debido al metabolismo celular (productos finales que se producen durante la fermentación) y los que modifican un compuesto agregado a la fermentación, proceso conocido como biotransformación (Hensirisak, 1997). El uso de biorreactores ha permitido resultados de laboratorio para hacer el escalamiento (hasta 100.000 litros) como estudio preliminar para la generación de procesos industriales que permitan el desarrollo de productos comerciales.

Antes de que se establezca un proceso de fermentación, el microorganismo generalmente debe ser aislado y algunas veces, modificado (Hensirisak, 1997). La fermentación a gran escala puede llevarse a cabo mediante el uso de hongos, levaduras o bacterias. Las levaduras son los microorganismos que mas se usan en la bioindustria, por su papel en la fabricación de bebidas alcohólicas (Ramírez y Pedroza, 2001).

Los procesos de fermentación con levaduras pueden ser anaeróbicos o aeróbicos, dependiendo de las condiciones ambientales y del producto final que se desee obtener. El crecimiento aerobio de *S. cerevisiae* en los azúcares fermentables se ha estudiado principalmente en la panadería (Scragg, 1991; Orlowski y Barford, 1987; Barford, 1990; Livense y Lim, 1982). Las características del crecimiento de *S. cerevisiae* son variables dependiendo de las condiciones a la que están sujetan las células. Muchos investigadores han estudiado los factores que afectan los patrones de crecimiento bajo condiciones aerobias. Slonimski (1953) divulgó la influencia de la aireación en el crecimiento de la levadura. Strittmatter (1957) y Bruver, *et al.*, (1975a, 1975b) definieron los diversos patrones de crecimiento para diferentes fuentes de carbono. Ball *et al.*, (1975) y Tustanoff y Bartley (1964) investigaron la adaptación de la levadura a la variación en la concentración del azúcar. En general este proceso requiere oxígeno para una máxima producción celular (Hensirisak, 1997).


2.3.1 Producción industrial de levaduras








A nivel industrial, la producción de levaduras *S. cerevisiae* se lleva a cabo mediante fermentaciones aeróbicas.

La levadura de panadería, que se produce industrialmente a nivel mundial, es principalmente de 2 tipos: la levadura fresca o comprimida (crema) que contiene un 70% de humedad, es de uso inmediato y se utiliza principalmente en la industria panadera y la seca o deshidratada que es para uso doméstico. Esta última se somete a un proceso de secado después de ser procesada y es desarrollada a partir de varias cepas, para producir levadura deshidratada de dos clases: activa que contiene 8% de humedad, es sólida y debe diluirse en agua tibia antes de su uso o deshidratada instantánea, que contiene 5% de humedad y no necesita rehidratarse (Parakulsuksatid, 2000; Safriet, 1994; CNMA, 1998).

Los productos comerciales de levadura existentes para uso en alimentación animal, aunque se producen de manera similar, varían ampliamente en la cepa, número de células viables presentes, modo de acción y formulación. En la tabla 1 se presentan algunos de los productos de este tipo que actualmente se encuentran disponibles en el mercado.

Tabla 1. Productos de levadura para uso en alimentación animal, disponibles en el mercado.

EMPRESA	PRODUCTO	DESCRIPCION
	Cultivo de Levaduras Diamond V XP™	Fermentando seco de cereales y levadura de panadería (<i>S. cerevisiae</i>) con su medio de cultivo, contiene vitaminas del complejo B y otros productos de fermentación.
	SelenoSource AF 2000	Levadura (<i>S. cerevisiae</i>) casi 100% pura enriquecida con selenio. Compuesta en su mayor parte por seleniometonina (fuente de selenio orgánico)
	Cultivo de levaduras Diamond V XPC™	<i>S. cerevisiae</i> en su medio de cultivo.
	Cultivo de levaduras Diamond V	<i>S. cerevisiae</i> en su medio de cultivo.

	Direct fed microbial blend for ruminants Diamond V XP DFM	Mezcla de cultivo de levadura, otros microorganismos y enzimas que hidrolizan almidón, triglicéridos y rompen celulosa y pectina. Mantiene un alto nivel de microorganismos en el rumen mejorando absorción de compuestos.
		Levadura activa seca (<i>S. cerevisiae</i>) para uso probiótico o alimentación microbiana directa en rumiantes
		Activo de levadura seca (<i>S. cerevisiae boulardii</i>) para uso probiótico en nutrición animal
		Derivado de una cepa específica de levadura (<i>S. cerevisiae</i>), beneficia el tracto gastro intestinal
		Selenio de levadura enriquecido para aumentar el desarrollo animal (aditivo alimenticio natural)
		Cultivo vivo de levadura <i>S. cerevisiae</i> , para aumentar la digestión y la eficiencia alimenticia.

Fuente: Diamond V; Lallemand y Alltech, 2006

La producción industrial de levaduras en su etapa inicial se lleva a cabo en el laboratorio donde un inóculo primario se deja crecer en un volumen entre 500 y 1000 mL durante 2 a 4 días. El contenido de este recipiente se utiliza para inocular el primero de varios fermentadores donde se van a producir sucesivamente los inóculos para las fases siguientes. Las etapas intermedias del proceso generalmente se llevan a cabo en lotes de 10 a 100 L cuya duración está entre 11 y 14 horas. La etapa final de producción puede consistir en fermentadores con volumen superior a los 500 L y puede operarse en batch, fed-batch o continuo. A medida que se asciende en escala de volumen, las condiciones de aireación y agitación se hacen más exigentes (Safriet, 1994).

En cultivos batch, el sistema se caracteriza por ser un sistema cerrado ya que no se añade ni se retira medio de cultivo y el microorganismo crece a partir de una limitada

cantidad de nutrientes hasta que se agota un componente esencial o se acumulan subproductos tóxicos hasta niveles que gradualmente inhiben el crecimiento (Sepúlveda, 2005; Ramírez y Pedroza, 2001). El crecimiento se puede analizar realizando una gráfica de concentración celular (x) contra el tiempo de incubación (t). En fermentaciones aeróbicas tipo batch, *S. cerevisiae* solo puede producir una cantidad limitada de enzimas de la respiración. Según Furukawa *et al.*, (1983), si la concentración de glucosa es mayor al 5% en el medio, las enzimas intermediarias de la respiración se inhiben favoreciendo la producción de etanol (Parakulsuksatid, 2000; Sepúlveda, 2005; Ramírez y Pedroza, 2001). Aunque el sistema batch tiene muchas limitaciones, este sistema sigue siendo utilizado para la producción a escala industrial (Parakulsuksatid, 2000).

En cultivos fed-batch se controlan dos elementos: la velocidad del flujo de alimentación y la concentración del nutriente limitante. Los nutrientes (glucosa) se adicionan intermitentemente durante la fase de producción. Esta técnica es efectiva particularmente en procesos en los cuales hay inhibición por sustrato, represión catabólica e inhibición por productos. La glucosa se alimenta a la levadura a una tasa casi igual a la cual se consume, aunque no es fácil lograr el equilibrio entre las tasas de alimentación y consumo de glucosa por la levadura. Desde que el número celular de levaduras crezca, la alimentación de glucosa se incrementa como se incrementa el número de células, pero en la práctica las fermentaciones solo manejan una tasa de alimentación. Este efecto presenta la mayor desventaja a gran escala de las fermentaciones fed-batch (Parakulsuksatid, 2000).

En fermentaciones continuas, es necesario alcanzar y mantener un flujo permanente y constante hasta alcanzar un estado estable donde la velocidad de dilución se iguala a la velocidad específica de crecimiento. En este estado estable, la concentración de azúcar en la fermentación será cerca de cero, causando una oxidación completa de toda la glucosa, mientras que una concentración alta de glucosa en la corriente de alimentación disminuye el crecimiento celular. En

presencia de exceso de glucosa, la levadura convierte una parte de esta a etanol, reduciendo el rendimiento en formación de biomasa, pero si el objetivo de la fermentación es obtener una conversión alta de glucosa a masa celular, es necesario que la concentración de glucosa en la fermentación permanezca cerca de cero y se adicione continuamente nueva glucosa (Parakulsuksatid, 2000).

En las fermentaciones aeróbicas que se llevan a cabo para la producción industrial de levadura, se generan residuos líquidos y emisiones de compuestos orgánicos volátiles (COV) principalmente como subproducto del proceso de fermentación, conformados básicamente por etanol (80%) y acetaldehído (compuesto contaminante); otros subproductos incluyen alcoholes como butanol, alcohol isopropílico, 2,3-Butanadiol, ácidos orgánicos y acetatos (CNMA, 1998).

Aunque las condiciones de operación para diferentes levaduras son muy similares, cada vez que se quiera implementar un nuevo proceso con una cepa diferente, se deben verificar las condiciones ambientales (temperatura, pH, aireación, requerimientos nutricionales y disponibilidad de los nutrientes) apropiadas que permitan la adaptación de los microorganismos al medio para alcanzar un adecuado desarrollo de la fermentación (Hensirisak, 1997). Igualmente se debe llevar a cabo el escalamiento del proceso para garantizar unas condiciones de operación a nivel industrial que generen la máxima condición de productividad (Safriet, 1994) y posterior diseño de planta para obtener un producto en cantidades comerciales. También, debe establecerse el proceso de separación y purificación (Hensirisak, 1997). Es en este punto donde las estrategias de control en la fermentación aerobia industrial son de gran importancia, con el fin de monitorear el transcurso de la fermentación, especialmente en los fermentadores industriales, dado el alto gasto económico implicado en ellos. En la mayoría de los casos es necesario no solo medir el crecimiento y la formación del producto, sino también controlar parámetros ambientales (temperatura, la concentración de oxígeno, el pH, la masa celular y la

concentración del producto) que se van alterando a medida que el proceso transcurre.

2.3.2 Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.2.1 Temperatura.

La temperatura es un factor relevante en los procesos de fermentación, debido a que desde el punto de vista microbiológico los microorganismos presentan temperaturas óptimas para su crecimiento donde se obtiene el mayor rendimiento. Esta temperatura suele encontrarse muy cerca de la temperatura máxima soportada y varía según la clase de microorganismo (Gómez, 2003). En las levaduras la temperatura afecta la capacidad de éstas para desdoblar los azúcares, la reproducción y el crecimiento celular, con temperaturas mínimas permisibles entre 0.3 y 0.5 °C, y las máximas entre 34 y 47 °C (Parakulsuksatid, 2000; Ramírez y Pedroza, 2001; Guilliermond, 1920). Las fermentaciones aeróbicas de *S. cerevisiae* son exotérmicas, por lo tanto, el fermentador debe enfriarse para mantener la temperatura en el rango óptimo para el crecimiento (CNMA, 1998).

2.3.2.2 pH.

El pH es, al igual que la temperatura, una variable significativa en la producción de biomasa (Sen y Babu, 2004). Cada microorganismo presenta un rango de pH donde su crecimiento es posible e incluso algunos presentan un pH óptimo, puesto que cambios en el pH son causantes de la desnaturalización de enzimas y de problemas en el intercambio de iones en la membrana celular. Tiene además influencia en la inhibición por pH debido al efecto que esta variable tiene sobre los centros activos de las enzimas, en la variación en las proporciones de los constituyentes del

producto final de una fermentación, en el conjunto de las floculaciones coloidales y en las características organolépticas del medio de cultivo tales como color y sabor (Ramírez y Pedroza, 2001). La mayoría de microorganismos son neutrofilos y crecen en un rango de pH entre 5 y 9 donde el pH varía durante el crecimiento a causa de las reacciones metabólicas que se llevan a cabo, consumiendo o produciendo sustancias ácidas o básicas que acidifican o basidifican el medio (Gómez, 2003). En la fermentación de levaduras, los valores de pH entre 3 y 6 generalmente favorecen el crecimiento y la actividad fermentativa (Ramírez y Pedroza, 2001). En la producción industrial de *S. cerevisiae* para uso en panadería, el pH se ajusta entre 4.5 y 5 (CNMA, 1998), permitiendo un crecimiento más rápido que en las bacterias, por lo tanto se tiene la ventaja de operar una fermentación con un menor riesgo de contaminación. Si se usa sacarosa como fuente de carbono el sistema es más sensible al pH que al utilizar glucosa, debido a que la inversión de la sacarosa se acelera a pH bajos (Ramírez y Pedroza, 2001).

2.3.2.3 Aireación y Agitación.

La actividad celular, la secreción de enzimas y la velocidad de fermentación al inicio del proceso, dependen estrechamente de las condiciones de aireación, por lo tanto, es conveniente airear el medio hasta el máximo. Aunque este proceso se dificulta por la poca solubilidad del gas en el medio de cultivo (líquido), este inconveniente puede superarse en parte si se logra una agitación adecuada dentro del fermentador (Ramírez y Pedroza, 2001; Gómez, 2003; Guilliermond, 1920). Generalmente la aireación del medio se realiza mediante el suministro de oxígeno (gas), el cual constituye un factor determinante para lograr un alto rendimiento en el crecimiento de los microorganismos aeróbicos, debido a que cuando el suplemento de aire se reduce, el microorganismo, deja o suprime casi completamente su multiplicación (Guilliermond, 1920). La glucosa puede ser utilizada de muchas maneras por *S. cerevisiae* dependiendo de la presencia de oxígeno y otras fuentes de carbono (Feldmann, 2005). Por este motivo la mayoría de estudios se basan en hallar un

equilibrio adecuado entre oxigenación y agitación que permitan el mayor rendimiento para el crecimiento del microorganismo (Gómez, 2003).

2.3.2.4 Medio de Cultivo.

La producción de levadura, requiere además de unas condiciones ambientales óptimas, de una variedad de nutrientes esenciales y vitaminas (Gómez, 2003). Los nutrientes existentes en los medios de cultivo dan a la célula microbiana todos los ingredientes requeridos para que produzca más células semejantes a ella misma (Ramírez y Pedroza, 2001). Por lo tanto, es conveniente considerar un diseño de medio de fermentación que genere las mejores garantías de crecimiento, el mejor desarrollo para el microorganismo y el máximo rendimiento de producción. El medio debe satisfacer los requerimientos nutricionales y ambientales del microorganismo, además de las restricciones técnico-económicas para minimizar los costos de separación y purificación. La determinación de los requerimientos nutrimentales, ambientales y la composición, dependen de la estequiometría de crecimiento y formación de producto (Duarte, 1998).

En la tabla 2 se muestran los requerimientos básicos de nutrientes para los microorganismos y las formas comunes de satisfacerlos en los cultivos.

Tabla 2. Requerimientos nutrimentales para los medios de cultivo

NUTRIENTE	FORMA QUÍMICA SUMINISTRADA AL MEDIO DE CULTIVO
Carbono	Glucosa, malato, acetato, piruvato, medios complejos como extracto de levadura, peptona
Hidrógeno	H ₂ O, Compuestos orgánicos
Oxígeno	H ₂ O, O ₂ , Compuestos orgánicos
Nitrógeno	Orgánicos: aminoácidos y bases nitrogenadas. Inorgánicos: KNO ₃ , (NH ₄) ₂ SO ₄ , N ₂ , NH ₄ Cl
Fósforo	Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄
Azufre	Na ₂ SO ₄ , H ₂ S
Potasio	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnesio	MgSO ₄ , MgCl ₂
Sodio	NaCl
Calcio	CaCl ₂
Hierro	Quelatos de hierro, FeCl ₃ , FeSO ₄
Micronutrientes	MnSO ₄ , CuCl ₂ , ZnCl ₂ , CoCl ₂ , NiCl ₂ , Na ₂ MoO ₄ , Na ₂ Se ₄

Madigan *et al.*, 1999.

Los medios se clasifican de acuerdo a la naturaleza de los componentes, en: 1) medios sintéticos o también llamados medios químicamente definidos y 2) medios complejos, en cuya composición intervienen sustancias de origen animal y vegetal, como peptonas, extracto de levadura, macerado de maíz, harina de soya, de pescado, de sangre, extracto de carne, entre otros, que aportan las sustancias fundamentales (macro y micronutrientes) (Ramírez y Pedroza, 2001).

La formulación del medio tiene que ver con los aspectos cuantitativos, estableciendo las concentraciones y cantidades de cada componente. Una primera aproximación a estos cálculos lo proporciona el contenido de la composición de biomasa del microorganismo respecto al porcentaje de nutrientes y minerales que son necesarios para su nutrición. Para promover el crecimiento celular son requeridos factores esenciales en los medios de cultivo como ciertos aminoácidos y vitaminas (Ramírez

y Pedroza, 2001). En el caso de la célula de levadura, para su desarrollo ésta requiere de nutrientes como el nitrógeno (sales de amonio, sulfato de amonio y urea), fósforo (fosfato diamónico y ácido fosfórico), magnesio (sales de magnesio), potasio, calcio, azufre, hidrocarburos y trazas de hierro, zinc, cobre, manganeso y molibdeno (Guilliermond, 1920; CNMA, 1998). En cuanto a las vitaminas son necesarias la biotina, inositol, ácido pantoténico y tiamina (Asenjo, 1995; CNMA, 1998).

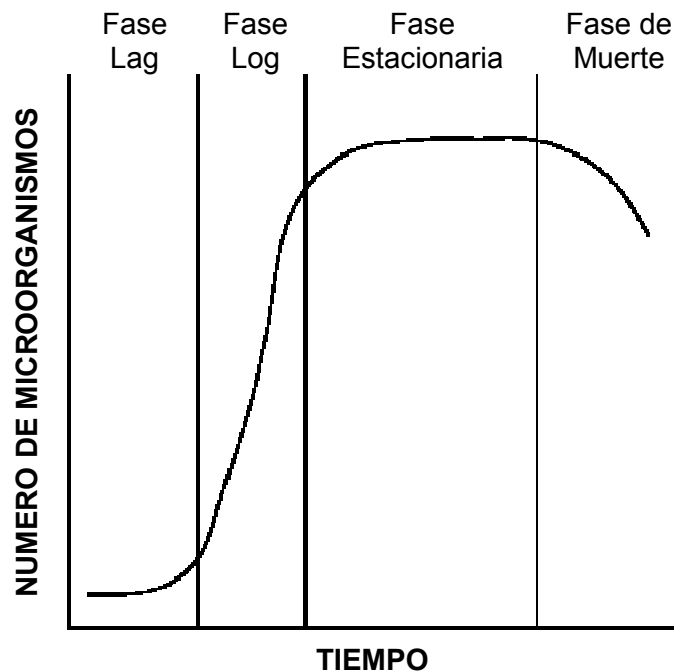
Para la fabricación industrial de levadura de panadería las principales materias primas son el cultivo puro de levadura y la melaza de caña que constituye la principal fuente de carbono del medio de cultivo, debido a su alto contenido de azúcares fermentables (45 a 55% en peso) en forma de sacarosa, glucosa y fructosa (CNMA, 1998). A nivel de laboratorio *S. cerevisiae* se cultiva en medios complejos que aportan a la célula los nutrientes necesarios para su crecimiento, entre los que se destacan YM, Goering y Van Soest y el de Pell y Pschofield. Sin embargo, la composición de los medios de cultivo debe ser constantemente adaptada a los procesos de fermentación (Ramírez y Pedroza, 2001).

2.4 CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE BIOMASA

Una fermentación aeróbica tipo batch o discontinua puede ser considerada como un sistema cerrado. En el tiempo inicial el medio de cultivo estéril dentro del fermentador se inocula con microorganismos y la incubación se da bajo condiciones fisiológicas óptimas. En el transcurso de toda la fermentación, solo se adiciona oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante, y un ácido o base para el control del pH, con el fin de garantizar las condiciones óptimas de operación que permitan obtener una alta concentración celular. La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa, y la concentración del metabolito cambia constantemente como resultado del metabolismo celular. En el transcurso de la

fermentación hay 4 fases de crecimiento, por las cuales pasa el microorganismo a través el tiempo, como se muestra en la figura 4: fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Sánchez, 2003).

Figura 3. Curva de crecimiento de los microorganismos.



Fuente: Gale, 2001

Fase Lag o de adaptación: también llamada fase de latencia. Cuando las células son transferidas de un medio a otro, no hay inicialmente un incremento en el número de células. Durante esta fase los microorganismos se toman un tiempo para adaptarse a su nuevo ambiente fisicoquímico y en ocasiones se sintetizan nuevas enzimas o componentes estructurales (Sánchez, 2003; Duarte, 1998). La duración de esta fase puede variar dependiendo del crecimiento de las células en el inóculo, el cual debe tener una edad tal que la mayor parte de las células que contiene deben encontrarse en fase exponencial y metabólicamente activas (Barrera, 2004). Es recomendable utilizar inóculos entre aproximadamente 5 y 10% del volumen total del reactor con el fin de reducir el tiempo de latencia (Soto, 2004).

Fase Exponencial o log: Al finalizar la fase lag, las células se han adaptado a las nuevas condiciones de crecimiento. En este punto las células se reproducen sin limitación de sustancias nutritivas a velocidad máxima. El crecimiento de las células se puede describir cuantitativamente como la duplicación del número de células o biomasa por unidad de tiempo. A través de esta fase las células alteran el medio constantemente tomando los sustratos y excretando los productos metabolizados. El crecimiento permanece constante durante esta fase. La velocidad de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato mientras exista sustrato en el medio y se correlaciona con la velocidad de crecimiento específico μ y la concentración de células x [células/ mL] según la ecuación número 1.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

La velocidad de crecimiento específico μ , es generalmente una función de tres parámetros: la concentración del sustrato limitante S , la tasa de crecimiento máxima μ_{\max} , y la constante específica de sustrato K_s , en cuya concentración se obtiene la mitad de la máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu = 0.5 \mu_{\max}$). Esta relación puede ser expresada por medio de la ecuación de Monod (2):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2)$$

La velocidad máxima de crecimiento específico μ_{\max} es de considerable importancia a nivel industrial, debido a que es en este punto donde se obtiene el valor máximo de μ a niveles de saturación de sustrato, relacionando la dependencia de los microorganismos con las condiciones del fermentador, donde a medida que aumenta la densidad de población decrece la concentración del sustrato limitante del crecimiento, causando un descenso de μ .

Fase estacionaria: ocurre cuando se agota una sustancia nutritiva y el sustrato se ha metabolizado, cuando se han formado sustancias tóxicas o ha ocurrido un cambio de condiciones como pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto. El crecimiento celular desciende lentamente o para completamente y en el caso en el que aun pueda estar ocurriendo crecimiento, este se contrarresta por la rapidez de muerte o lisis celular. La biomasa incrementa sólo gradualmente o permanece constante durante la fase estacionaria, aunque la composición de las células puede cambiar (Sánchez, 2003; Duarte, 1998).

Fase de muerte: también llamada fase de decaimiento. En esta fase la reserva de energía de las células se ha acabado, debido a condiciones de inanición o como consecuencia del metabolismo de mantenimiento de algunas células. El tiempo entre la fase estacionaria y la fase de muerte depende del microorganismo y el proceso utilizado (Sánchez, 2003; Duarte, 1998).

2.5 ESCALAMIENTO DE FERMENTACIONES

Escalamiento significa un cambio en la escala de volumen de proceso. Este cambio generalmente viene acompañado de dificultades debido a que muchos de los parámetros de proceso se encuentran directamente relacionados con el tamaño y geometría del reactor. El objetivo principal es cambiar la escala de una reacción biológica aumentando o disminuyendo el volumen de trabajo, evitando que se reduzca su productividad (Parra, 2004).

Dependiendo de las necesidades, el escalamiento puede hacerse desde un resultado de laboratorio o desde determinadas condiciones ambientales obtenidas a

nivel de producción industrial. Si se selecciona el segundo criterio, es necesario determinar el tamaño mínimo a utilizarse a nivel de laboratorio o planta piloto, que posteriormente pueda trasladarse a escala industrial. La solución de estos problemas depende de la manera que se escoja para atacarlos, y esa manera dependerá a su vez del tipo de problema particular que se trate (Quintero, 1981).

Por lo general el escalamiento consta de tres etapas. A nivel de laboratorio se opera en frascos agitados (~ 500 mL) o pequeños fermentadores, donde se buscan nuevos productos, se estudian mecanismos de control, se mejoran las cepas de producción y se ajustan las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo (temperatura, pH y composición del medio de cultivo). En la planta piloto (5-500 L), se selecciona un parámetro de escalamiento y se estudian efectos de aireación, agitación, temperatura y control de pH. En los fermentadores de producción (5.000-400.000 L) se validan los resultados obtenidos en la planta piloto y se debe operar siguiendo un calendario fijo (Jiménez y Rojas, 2003).

El problema del paso de una escala a otra (escalamiento) es uno de los de mayor importancia no sólo en fermentación sino en la industria en general. En el caso de la fermentación aeróbica, el predecir resultados a escala de producción basados en el escalamiento de datos obtenidos en el laboratorio o en la planta piloto requiere un análisis cuidadoso de cada una de las escalas, tanto en sus variables fisicoquímicas como biológicas. Para entender el proceso de escalamiento se deben tener en cuenta todos los fenómenos que ocurren en el biorreactor como la cinética de las reacciones, termodinámica y los fenómenos de transferencia de masa, calor y fluidos (Jiménez y Rojas, 2003). Es además necesario, conocer las herramientas de trabajo que se tienen a disposición para iniciar el escalamiento. Los diferentes escenarios que pueden presentarse son: un proceso nuevo y una planta nueva, un proceso nuevo en un equipo existente, o la modificación del equipo existente para lograr una optimización del proceso (Parra, 2004; Quintero, 1981). En el caso en el que se tienen los equipos y se pretende trasladar las condiciones de operación de uno a

otro (revoluciones por minuto, cantidad de aire por minuto, potencia por unidad de volumen), lo importante es establecer relaciones entre las variables que aseguren la similitud en el medio ambiente al cambiar de escala. Desde el punto de vista de diseño se debe tratar de delinear las variables físicas (geometría, número de impulsores, etc.) del fermentador y procurar que se mantengan las mismas condiciones de mezclado, agitación y aireación, aunque esta no es una tarea fácil debido a las limitaciones dimensionales y económicas que restringen los procedimientos de escalamiento (Quintero, 1981).

La metodología del cambio de escala se fundamenta en la selección de una estrategia con el propósito de predecir el comportamiento de las variables no controladas y su consecuencia sobre el diseño global del proceso (Duarte, 1998). Dentro de estas metodologías se encuentran los métodos fundamentales (ecuaciones de microbalances de transferencia de momento, masa y calor), semifundamentales (ecuaciones simplificadas de transporte), análisis de régimen (análisis de proceso para encontrar las etapas limitantes), análisis dimensional (basada en analogías de las ecuaciones generadas de los balances de momento, masa y calor) y reglas empíricas (de acuerdo con la experiencia se fijan condiciones que son factores limitantes del proceso). En biotecnología es común el uso de las reglas empíricas, que consiste en mantener constante el valor de un parámetro de operación en ambas escalas. Para la selección de este parámetro es necesario estudiar el efecto que este presenta sobre el rendimiento de la variable de respuesta a evaluar en el producto final de la fermentación. El parámetro de operación se elige de acuerdo a cada microorganismo, sus necesidades y las limitaciones que se presentan en la fermentación y el valor en el cual se debe mantener constante se selecciona cuando el valor de la variable de respuesta se vuelve independiente de este o presenta un máximo. Entre los más utilizados se encuentran el $k_L a$, cuando la transferencia de oxígeno juega un papel fundamental en el proceso y la velocidad en la punta del agitador cuando los microorganismos son sensibles a esfuerzos cortantes (Jiménez y Rojas, 2003).

El escalamiento, puede verse perturbado por las condiciones que afectan el crecimiento de los microorganismos y la formación de productos en un proceso bioquímico (temperatura, presión, pH, velocidad de agitación y concentración de nutrientes) (Duarte, 1998). Las variables más críticas son la temperatura y la concentración de oxígeno porque al incrementar el volumen se hace más difícil la transferencia de calor y la transferencia de masa, siendo necesarios sistemas más eficientes de calentamiento, agitación y aireación (Asenjo, 1995; Shuler, 2001).

2.6 CONDICIONES Y CRITERIOS DE ESCALAMIENTO

Existen diversos criterios de escalamiento, que se encuentran directamente vinculados con las variables que afectan de manera importante el sistema de producción. Entre estos se encuentran: número de Reynolds, tiempo de mezcla, velocidad en la punta del impulsor, potencia por unidad de volumen (P/V), coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) y similitud geométrica del reactor, entre otros. Sin embargo, según Quintero (1981), el número de Reynolds y el tiempo de mezclado no son buenos criterios de escalamiento. En el primer caso porque P/V es demasiado pequeño y no aseguraría una buena translación, y en el segundo se requiere un consumo de potencia muy alto, generando altos costos de operación.

Escalar utilizando como criterio la velocidad de la punta del impulsor cuando las células microbianas o agregados celulares pueden afectarse por grandes esfuerzos constantes, disminuye la potencia por unidad de volumen en la misma proporción que aumenta la escala del fermentador, provocando que el $k_L a$ disminuya (Quintero, 1981).

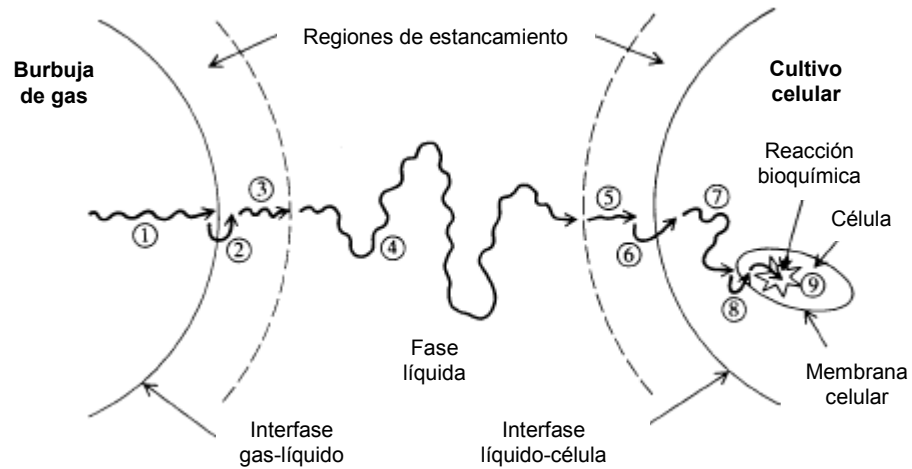
De acuerdo con lo anterior, al parecer los mejores criterios para pasar de una escala a otra son la relación P/V y el $k_L a$ (Quintero, 1981).

2.6.1 Transferencia de masa

Para suministrar aireación al medio de cultivo, en la mayoría de los casos se utiliza aire como fuente de oxígeno debido a su disponibilidad y bajo costo, sin embargo, esta provisión tiene que ser lo suficientemente alta para satisfacer la demanda de los microorganismos (Sepúlveda, 2005), lo que se ve interferido por su baja solubilidad en agua, que es del orden de 9 ppm a una presión de 1 atm y 20 °C (la solubilidad de los gases disminuye al aumentar la temperatura) (Gómez, 2003; Jiménez y Rojas, 2003). Adicionalmente, para que el oxígeno pueda ser transferido desde una burbuja de gas a una de fase líquida que contiene células, debe pasar a través de una serie de resistencias de transporte (figura 4), como se mencionan a continuación (Sánchez, 2003):

1. Difusión desde la fase gaseosa hasta la interfase gas-líquido
2. Movimiento a través de la interfase gas-líquido
3. Difusión del soluto a través de la región líquida no mezclada alrededor de la burbuja.
4. Transporte del soluto a través de la fase líquida hasta una segunda región de líquido relativamente no mezclada alrededor de la célula.
5. Transporte a través de la segunda región de líquido no mezclada asociada con las células
6. Transporte por difusión en la pared celular
7. Transporte a través de la membrana celular para obtener una reacción intracelular.

Figura 4. Transporte de oxígeno de una burbuja de gas hasta el interior de la célula.



Fuente: Parakulsuksatid, 2000

Para que no existan limitaciones de transferencia de oxígeno, la velocidad de transferencia de oxígeno a los microorganismos (OTR) siempre debe ser mayor, o en un caso crítico, igual a la demanda de oxígeno (OUR). La transferencia de oxígeno (masa) está dada por la ecuación numero 3 (Jiménez y Rojas, 2003):

$$Na = k_L a (C^* - C) = OTR \quad (3)$$

Donde:

Na : Velocidad total de transferencia de oxígeno por unidad de volumen

k_L : Coeficiente de transferencia de oxígeno en la fase líquida (estancamiento o frontera)

a : Superficie de intercambio específico

$k_L a$: Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

C^* : Concentración de aire disuelto en la fase frontera gas-líquido

C : Concentración de aire disuelto en el seno de la solución

OTR : Velocidad de transferencia de oxígeno

Y la demanda de oxígeno por la ecuación 4:

$$OUR = Q_{O_2} x \quad (4)$$

Donde Q_{O_2} es la demanda específica de oxígeno y x es la concentración de biomasa.

A bajas concentraciones celulares la OTR es baja, aun cuando las células pueden estar respirando a su máxima velocidad de demanda específica de oxígeno ($Q_{O_2 \max}$); adicionalmente, la concentración de oxígeno en el medio (C_{O_2}) se incrementa y se aproxima al valor de saturación ($C^*_{O_2}$). Así, el oxígeno se presenta en una condición no limitante para el crecimiento de los microorganismos. A medida que la concentración de biomasa se incrementa, OUR se incrementa y como consecuencia la concentración de oxígeno disuelto disminuye. A unas concentraciones de operación definidas, una alta concentración celular hará que el valor de oxígeno disuelto alcance la concentración crítica de oxígeno (C_{crit}) cuyo valor depende de las características fisiológicas de los microorganismos. A C_{crit} el cultivo aún cuenta con la cantidad de oxígeno demandada por la concentración celular presente. A partir de este valor un incremento en la biomasa ya no dispone del oxígeno que necesita para su desarrollo normal (Jiménez y Rojas, 2003).

En fermentaciones aeróbicas, la transferencia de masa esta determinada por el valor del coeficiente de transferencia de oxígeno o $k_L a$, que como se mencionó anteriormente, generalmente se constituye en el criterio de escalamiento. Es importante tener en cuenta que este factor es función de muchas variables relacionadas en diferentes correlaciones.

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno o k_La es considerado como un parámetro crítico para el funcionamiento del biorreactor, cambia en el transcurso de la fermentación, se usa para medir la capacidad de aireación de un reactor, y depende tanto de variables de operación como la agitación y la aireación, así como del diseño y las condiciones de operación del mismo, que incluyen el diámetro, capacidad, potencia y densidad, viscosidad y composición del medio de cultivo, tasa de agitación, diseño de eliminación de gas, estructura del microorganismo, agente antiespumante y temperatura (Sepúlveda, 2005; Sánchez, 2003). Al emplear como criterio el k_La deben especificarse las condiciones ambientales y tiempo de fermentación en el que fue determinado, debido a que puede ocurrir que se elija un k_La menor que el necesario y al hacer el cambio de escala, descubrir que no es suficiente (Quintero, 1981).

La aireación y agitación son los parámetros ambientales que se encuentran directamente relacionados con el coeficiente de transferencia de masa y por lo tanto son los que pueden alterarlo, generando al mismo tiempo una variación en las condiciones de operación como la disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, esfuerzos cortantes y producción de espuma (Parra, 2004).

El propósito principal de la aireación es poner en contacto el gas que generalmente es oxígeno con el líquido o caldo fermentativo, mientras que la agitación pretende dispersar las burbujas del gas para disminuir su tamaño (a menor tamaño de burbuja mayor área de contacto y aumento de la transferencia de masa), provocando turbulencia y homogenización del cultivo. Por otra parte el burbujeo también sirve como medio de agitación (Jiménez y Rojas, 2003).

2.6.1.1 Determinación de la transferencia de oxígeno.

La tasa de transferencia de oxígeno, puede determinarse mediante correlaciones empíricas o métodos experimentales. Las correlaciones de $k_L a$ son muy abundantes pero ninguna es de uso general y casi todas se basan en la oxidación del sulfito de sodio (Na_2SO_3) y por lo tanto solo sirven como una guía. Entre ellas se encuentran la de Cooper , Richards, Fukuda, Hospodka, Taguchi, Humphrey, Westertep y Hatch, entre otros (Quintero, 1981). Entre los diferentes métodos experimentales, se encuentran el método dinámico, el método del sulfito, la medición directa de la tasa de transferencia volumétrica de oxígeno y el método indirecto o de desgasificación (Sánchez, 2003).

Cuando se desea modificar el $k_L a$ para aumentarlo, pueden realizarse diferentes cambios, algunos de ellos son: diluir el caldo de fermentación, aumentar la agitación (revoluciones por minuto, N), la aireación o la presión, cambiar el diámetro del impulsor o el número de baffles, disminuir la viscosidad, variar el tamaño del inóculo o aumentar la potencia por unidad de volumen (P/V) (Quintero, 1981).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

Las fermentaciones preliminares fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Microbiología Ruminal del programa de fisiología y nutrición animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), ubicada en el Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca; y en el laboratorio de Investigaciones en Microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá; las demás fermentaciones y pruebas se realizaron en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT en la ciudad de Medellín.

3.2 MICROORGANISMO

La cepa empleada durante la investigación es un aislado nativo de levadura tipo *Saccharomyces* spp. perteneciente al banco de germoplasma de microorganismos con interés en control biológico de CORPOICA y que fue donado a la empresa ALQUERIA S.A para el desarrollo de un proyecto de innovación tecnológica.

3.3 MATERIALES

3.3.1 Medios de cultivo

- ✓ **YM sólido:** compuesto por extracto de malta (3 g/L) (Oxoid), extracto de levadura (3 g/L) (Oxoid), peptona universal (5 g/L) (Merck), dextrosa (10 g/L) (Driver) y agar (20 g/L) (Merck).

- ✓ **YM Líquido:** compuesto por extracto de malta (3 g/L) (Oxoid), extracto de levadura (3 g/L) (Oxoid), peptona universal (5 g/L) (Merck) y dextrosa (10 g/L) (Driver).

- ✓ **YM modificado:** compuesto por extracto de malta (3 g/L) (Oxoid), extracto de levadura (3 g/L) (Oxoid), peptona universal (5 g/L) (Merck) y dextrosa (30 g/L) (Driver).

- ✓ **YM modificado con melaza:** compuesto por extracto de malta (3 g/L) (Oxoid), extracto de levadura (3 g/L) (Oxoid), peptona universal (5 g/L) (Merck) y melaza (30 g/L).

Los medios de cultivo fueron previamente esterilizados durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi en una autoclave horizontal EASTERN modelo EA-620T antes de su uso.

3.3.2 Activación de la cepa

La cepa activa fue suministrada directamente por ALQUERIA S.A en caja petri con medio YM sólido y se encontraba en fase de crecimiento adecuada para repicarse.

Para obtener la cepa de trabajo (figura 5), se realizó un cultivo de reserva en cajas petri con el mismo medio, incubándolo por 48 h a 30 °C en una incubadora digital WTC Binder, luego se almacenó a 4 °C y fue subcultivado cada mes para mantener su viabilidad.

Figura 5. Fotografía de la cepa de levadura *Saccharomyces* spp. en medio YM sólido después de 48 h de incubación (cultivo de reserva).



Fuente: Autor.

3.3.3 Preparación del pre-inóculo e inóculo

Se prepararon 200 mL de medio YM líquido, a los cuales se ajustó el pH a 4,5 con soluciones de HCl (10 %) y NaOH (2 N). De este volumen, se tomó el 10 % en un erlenmeyer de 50 mL para el preinóculo y el otro 90 % en un erlenmeyer de 1000 mL

para el inóculo y se llevaron a esterilización en un autoclave horizontal EASTERN modelo EA-620T, a 120°C por 15 minutos. El preinóculo se preparó adicionando una azada proveniente de la caja petri con medio YM (numeral 3.3.2) y fue llevado a un agitador orbital New Brunswick Scientific C1 Classic series, a 150 RPM y 28 °C por 12 horas, al cabo de las cuales el cultivo fue depositado en el erlenmeyer de 1.000 mL bajo las mismas condiciones de agitación temperatura y tiempo. Tanto el volumen del pre-inóculo como el de los inóculos corresponde al 10% del volumen de trabajo en cada fermentación.

3.3.4 Biotransformaciones

3.3.4.1 Fermentaciones Preliminares

En esta etapa se estableció la cinética de crecimiento para determinar el tiempo total de cultivo y posteriormente se llevaron a cabo fermentaciones para evaluar la producción de biomasa en los diferentes medios de cultivo propuestos por Manovacía y Moreno (2005).

El montaje realizado con el fin de garantizar las condiciones de temperatura y agitación necesarias, consistió en introducir el agitador orbital New Brunswick Scientific C1 Classic series dentro de una incubadora a una temperatura constante. Tanto el agitador como la incubadora, poseen controladores manuales que permiten regular las revoluciones de trabajo y temperatura deseada.

3.3.4.1.1 Condiciones de operación

Para determinar el tiempo total de cultivo y evaluar los diferentes medios, se realizaron fermentaciones en erlenmeyers de 500 mL con 250 mL de medio.

Para establecer la cinética de crecimiento se prepararon el pre-inóculo e inóculo (numeral 3.3.3), la fermentación se llevó a cabo durante 22 h, a pH 4,5 en medio YM modificado con melaza, 25 °C y 150 RPM.

Para determinar el mejor medio de cultivo, se realizaron fermentaciones en medio YM líquido, YM modificado y YM modificado con melaza durante 24 h, a 25 °C y 150 RPM las cuales fueron inoculadas con una cantidad de células necesarias para obtener una concentración celular inicial de 1×10^7 células/mL, ajustados según un previo conteo realizado en cámara de Neubauer como lo sugirieron Manovacía y Moreno (2005), quienes previamente habían trabajado con la cepa utilizada en esta investigación.

3.3.4.1.2 Toma de muestras

Para establecer la cinética de crecimiento se tomaron muestras antes y después de la inoculación (tiempo 0) y cada 2 horas durante 24 h. Las muestras fueron congeladas a -10 °C y posteriormente procesadas para determinar la concentración celular por la técnica del peso seco y el sobrenadante se conservó para determinarle la concentración de azúcares reductores por la técnica del DNS.

Con el fin de determinar el mejor crecimiento celular en los diferentes medios de cultivo, se tomaron muestras al medio antes de la inoculación, después de la inoculación (tiempo 0) y a las 24 h. Las muestras fueron congeladas a -10 °C y posteriormente procesadas para determinar la concentración celular por conteo en cámara de Neubauer y por la técnica del peso seco. Los ensayos se realizaron por duplicado cada uno con 3 repeticiones.

3.3.4.2 Fermentaciones en frascos agitados

Los erlenmeyers se ubicaron en un agitador orbital New Brunswick Scientific C1 Classic series con diámetro de orbita de 2.54 cm a diferentes velocidades de agitación.

Figura 6. Montaje de las fermentaciones en frascos agitados



Fuente: Autor.

3.3.4.2.1 Condiciones de operación

Las fermentaciones se llevaron a cabo en erlenmeyers de 1.000 mL con un volumen de trabajo de 250 mL. El pH fue ajustado al medio de cultivo (YM modificado con (numeral 3.3.3) y se llevó a agitación durante 12 h a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Según el diseño de experimentos (ver numeral 3.4) se estableció la velocidad de agitación y el pH del medio de cultivo

3.3.4.2.2 Toma de muestras

Se tomaron muestras al medio antes de la inoculación, en el tiempo 0 y cada 2 horas. En cada toma de muestra se registró el pH mediante un pH metro *ex situ* marca Metrohm; las muestras se congelaron a -10 °C hasta su procesamiento para determinar la producción de biomasa por el método de peso seco y el consumo de azúcares por DNS.

Los ensayos se realizaron por duplicado y con 3 repeticiones.

3.3.4.3 Fermentaciones en biorreactor

Para las fermentaciones batch se utilizó el biorreactor BIOENGINEERING CH 8636 (figura 7) de 3 L con un volumen de trabajo de 2 L.

Este equipo está equipado con un controlador de agitación, temperatura, pH, oxígeno disuelto, espuma, nivel del recipiente y flujo de bombas peristálticas. Se utilizaron 2 turbinas tipo rushton de 6 aspas planas.

Figura 7. Biorreactor BIOENGINEERING CH 8636.



Fuente: Autor.

3.3.4.3.1 Condiciones de operación

El equipo se trabajó con un volumen de 2 L, una agitación de 150 y 200 RPM, una temperatura de 28° C, aireación de 1vvm y a un pH inicial de 4, el cual no se controló durante la fermentación.

3.3.4.3.2 Toma de muestras

Se tomaron muestras al medio antes de la inoculación, en el tiempo 0 y cada 2 horas durante 12 horas. En cada toma de muestra se registró la temperatura mediante el controlador del equipo y el pH con un pH metro *ex situ* marca Metrohm. Las muestras se congelaron a -10 °C hasta su procesamiento para determinar la producción de biomasa por el método de peso seco y el consumo de azúcares por DNS.

3.4 DISEÑO METODOLÓGICO

La metodología experimental se llevó a cabo en 3 etapas. En la primera se realizaron fermentaciones en agitadores orbitales para confirmar la formulación del mejor medio de cultivo para la producción de biomasa de un aislado de levadura según lo reportado por Manovacia y Moreno (2005). A partir de estos resultados se evaluó la producción de biomasa mediante 2 técnicas diferentes: la técnica del peso seco y conteo celular en cámara de Neubauer y se eligió el medio más adecuado para realizar las etapas siguientes.

En la segunda etapa se llevaron a cabo fermentaciones en un agitador orbital para determinar los efectos del pH y la agitación sobre la cinética de producción de biomasa y de consumo de sustrato. Este diseño de experimentos consistió en un arreglo de 2 factores (pH y agitación) y 3 niveles cada uno por triplicado. En la tabla 3, se muestran los valores para cada nivel y la combinación en que fueron evaluados.

Tabla 3. Diseño de experimentos para la evaluación en agitadores orbitales

pH	Agitación (RPM)
4	100
5	100
5,5	100
4	150
5	150
5,5	150
4	200
5	200
5,5	200

A partir de la evaluación de la cinética de producción de biomasa y consumo de sustrato se evaluó la máxima velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) por medio del modelo exponencial y el rendimiento de sustrato en biomasa.

De acuerdo con la información obtenida en el agitador orbital, se ajustaron las condiciones del proceso y se llevó a cabo una tercera etapa. Esta última consistió en escalar el proceso fermentativo a un biorreactor de 3 L por medio del método de $k_L a$ constante con el fin de reproducir la concentración final de biomasa (g/L) obtenida en el agitador orbital.

3.4.1 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del software STATGRAPHICS PLUS 5.0.

En la primera etapa se realizó un análisis de varianza unifactorial (ANOVA), para establecer en cual medio de cultivo de los utilizados hubo una mayor producción de biomasa.

Para la segunda etapa se realizaron pruebas de análisis de varianza multifactorial (ANOVA), con el fin de determinar si el pH y la agitación ejercieron un efecto significativo sobre la variable de respuesta del sistema. En la prueba ANOVA se establecieron 3 hipótesis nulas:

- ✓ Hipótesis de interacción: no hay efecto de interacción entre el pH y la agitación (RPM).
- ✓ Hipótesis del pH: no ejerce un efecto significativo sobre la variable de respuesta.

- ✓ Hipótesis de las RPM: no ejercen un efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Para las comparaciones múltiples de medias, se utilizó la prueba Student- Newman-Keuls y se chequeó la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Bartlett's. El nivel de significancia usado en las pruebas fue de 0,05.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Concentración celular por conteo

Este método indirecto para determinar los microorganismos viables, consiste en poner una alícuota de 20 µL proveniente de una dilución 10^3 sobre la cámara de Neubauer, posteriormente se realiza un conteo con ayuda del microscopio. El conteo fue realizado en 5 campos por cada cuadrante.

Para obtener la concentración celular, fue necesaria aplicar la ecuación 5:

$$Celulas = 16 * 10^4 \times Factor.de.diluci\grave{o}n \times promedio \left(\frac{\sum 5campos}{20} \right) \quad (5)$$

3.5.2 Determinación de biomasa

La cantidad de biomasa se determinó mediante Densidad Óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro marca Cole Parmer, Helios Gamma, y se relacionó con el peso seco (PS) mediante una curva de calibración. La concentración celular se expresó en gramos por litro [g/L]. (Ver anexo A)

3.5.3 Cuantificación de consumo de sustrato

Para determinar el consumo de sustrato se realizó la cuantificación de los azúcares reductores mediante la técnica del DNS (Acido 3, 5 Dinitro Salicílico) (Miller *et al.*, 1958). Mediante una curva de calibración se relacionan la absorbancia leída en un espectrofotómetro marca Cole Parmer, Helios Gamma a 540 nm y la concentración de azúcares [g/L]. (Ver anexo B).

3.6 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

3.6.1 Máxima velocidad de crecimiento específico

Para determinar la cinética de crecimiento del microorganismo, se asumió una reacción de orden uno y se graficó el logaritmo natural de la concentración celular ($\ln x$) contra el tiempo (t) de la fase exponencial. La pendiente de esta línea corresponde a la máxima velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) y el intercepto al logaritmo natural de la concentración celular en el tiempo 0 ($\ln x_0$).

3.6.2 Rendimientos observados

El rendimiento observado se calculó al graficar la concentración de la biomasa [x] contra la concentración del sustrato [S] obtenidos durante todo el tiempo de fermentación. La linealización de los resultados permite determinar la pendiente que es equivalente al rendimiento observado para la biomasa en el sustrato ($Y'_{x/s}$), según se describe en la ecuación 6.

$$Y'_{x/s} = -\frac{dx}{dS} = \frac{r_x}{r_s} \quad (6)$$

3.7 ESCALAMIENTO

3.7.1 Desde frascos agitados hasta biorreactor

Después de determinar las mejores condiciones de pH y RPM a nivel de frascos agitados, se escaló el proceso teniendo como parámetro de escalamiento el k_La y mediante la ecuación planteada por Maier *et al.*, (2001). A partir de estos resultados y con ayuda de una caracterización realizada al biorreactor BIOENGINEERING CH 8636 a partir de la cual se obtuvo una gráfica que correlaciona el k_La con las RPM, fue posible establecer las condiciones a utilizar en el equipo. Como la biomasa obtenida al final de esta etapa presentó diferencias estadísticamente significativas en relación a las de los frascos agitados, se decidió realizar una nueva fermentación en el biorreactor a las mejores condiciones encontradas en la escala anterior. De este último ensayo, se obtuvieron valores consistentes con los encontrados en el caso de frascos agitados, por lo tanto estas fueron las condiciones utilizadas para la etapa siguiente.

3.7.2 Biorreactores.

Teniendo las mejores condiciones de cultivo para la cual se obtuvo una buena cantidad de biomasa a nivel de biorreactor a 2 L, se procedió a realizar el escalamiento conceptual utilizando la correlación del k_La reportada por Van't Riet (1979) como criterio de escalamiento hasta un volumen de trabajo de 100 L. Este escalamiento se realizó en 2 etapas con el fin de mantener las relaciones del sistema, para esto fue necesario determinar los datos de operación y diseño según las correlaciones reportadas por Doran para cada volumen (1999) (Anexo H) como el diámetro interno del reactor, diámetro del impulsor, altura del líquido, altura del fondo del reactor al impeler, ancho del impeler, alto del impeler y ancho del baffle. Adicionalmente, fue necesario determinar algunas propiedades del medio de cultivo como la densidad y viscosidad, y el valor experimental del k_La , determinado por el

método dinámico por Llano (2006) en una fermentación de levaduras comerciales *Saccharomyces cerevisiae*, según se describe en el numeral 3.7.2.1.

Teniendo toda la información pertinente se llevó a cabo un proceso de cálculo que se detalla en los resultados, mediante el cual fue posible determinar las condiciones adecuadas para cada escala garantizando una agitación, aireación, caudal de aire y potencia necesarias para el buen desempeño de la fermentación que permita obtener una cantidad de biomasa análoga a la generada tanto en frascos agitados como a nivel de biorreactor a un volumen de 2 L.

3.7.2.1 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$)

El coeficiente de transferencia de masa se determinó para las fermentaciones realizadas en el biorreactor a las 12 horas de cultivo mediante el método dinámico de eliminación de gas. En esta técnica la estimación del $k_L a$ se lleva a cabo durante la fermentación, y por lo tanto la valoración de la eficiencia del reactor es más real (Sepúlveda, 2005). El valor del $k_L a$ se determina mediante un balance de masa para el oxígeno disuelto en un medio líquido en estado inestable (Parakulsuksatid, 2000). (Ver anexo C)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

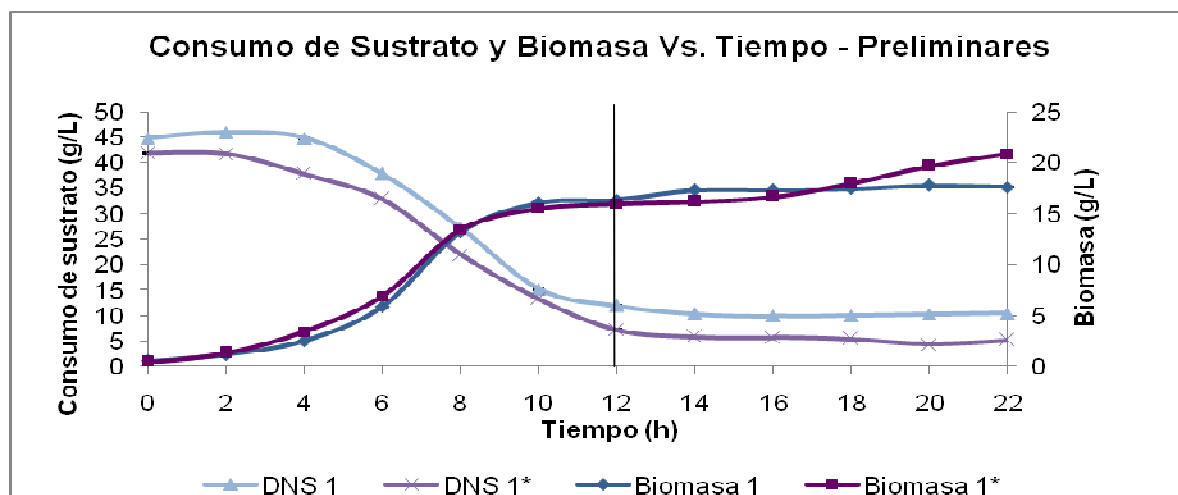
4.1 BIOTRANSFORMACIONES

Los experimentos se llevaron a cabo en tres etapas. Primero se realizaron fermentaciones preliminares para determinar el tiempo de cultivo y el mejor medio de cultivo para la producción de las levaduras nativas, *Saccharomyces* spp.. Posteriormente se realizaron fermentaciones en frascos agitados a temperatura constante y diferentes niveles de agitación y pH para determinar las mejores condiciones que permitieran obtener la mayor cantidad de biomasa posible. Finalmente se realizó un escalamiento en biorreactor de 2 L para comprobar las condiciones de la escala anterior.

4.1.1 Fermentaciones preliminares

Las fermentaciones preliminares se realizaron con el fin de determinar el medio de cultivo adecuado para producir una mayor cantidad de biomasa. La cinética de crecimiento celular para *Saccharomyces* spp. obtenida en el medio de cultivo YM modificado con melaza en agitador orbital, presentó un comportamiento exponencial el cual se puede observar en la figura 8. De estas curvas independientes entre sí, se estableció un tiempo de cultivo de 12 horas, al cabo del cual el microorganismo ya se encontraba en fase estacionaria. (Anexo D).

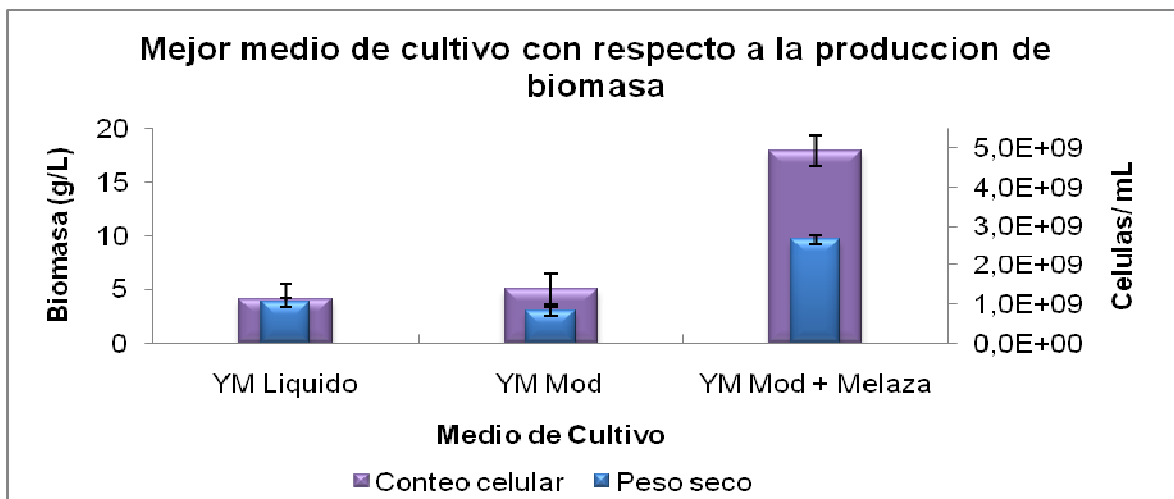
Figura 8. Curvas de crecimiento preliminares para *Saccharomyces* spp. en medio YM modificado con melaza.



Adicionalmente, para confirmar que este tiempo era el adecuado, se determinó el consumo de sustrato y se obtuvo una concentración que paso de 43 g/L (hora 0) a 8 g/L (hora 12), concentración a la cual las células presentan un metabolismo respiro-fermentativo, por lo tanto la producción de biomasa es baja, mientras que se favorece la producción de etanol.

Con respecto a la evaluación del mejor medio de cultivo para la producción de biomasa (figura 9) se determinó que el mejor medio de los estudiados para llevar a cabo las fermentaciones fue el YM modificado con melaza, debido a que el crecimiento celular presenta un mejor desempeño con respecto a los demás medios estudiaos, lo cual se comprobó al determinar la biomasa tanto por el método del peso seco como por conteo en cámara de Neubauer. Aunque los valores encontrados por las dos técnicas fueron muy diferentes, el mejor crecimiento siempre se presentó en el medio YM modificado con melaza (Anexo D). En la figura 9, se muestra el promedio de la concentración celular al cabo de 24 h de fermentación para cada medio y por los dos métodos evaluados con sus respectivos errores estándar (barras verticales).

Figura 9. Evaluación de los medios de cultivo para el crecimiento de la levadura nativa, *Saccharomyces* spp., por las técnicas de peso seco y conteo en cámara de Neubauer.



Se llevó a cabo un análisis estadístico para la biomasa determinada únicamente mediante la técnica del peso seco, ya que esta fue la técnica que se utilizó en todas la etapas de la investigación. Este análisis se realizó no solo para corroborar que el mejor medio fue el YM modificado con melaza, sino para observar si es relevante el uso de diferentes medios de cultivo en la producción de este tipo de levaduras. Inicialmente se utilizó la prueba de Bartlett's para comprobar la variabilidad de los datos, que arrojó un P- valor superior a 0.05, indicando que el análisis de varianza es válido debido a que hay homogeneidad en los datos. Posteriormente se realizó la prueba unifactorial ANOVA tomando como variable dependiente la biomasa (g/L) y el medio como factor.

En la tabla 4 se muestran los resultados, de acuerdo con los cuales, la producción de biomasa se afecta significativamente (P- valor < 0.05) por el medio de cultivo empleado para su crecimiento, lo que confirma que aunque el microorganismo presenta un crecimiento para todos los medios estudiados, se adapta mejor a la formulación con mayor cantidad de fuente de carbono. Esto se comprobó realizando la prueba de las medias esquematizada en la figura 9, a partir de la cual, es posible

afirmar que para el medio de cultivo con melaza el crecimiento celular fue mucho mejor y presenta valores significativamente mayores que los arrojados por los medios YM líquido y YM modificado. La prueba Student-Newman-Keuls confirma esta hipótesis, presentando como grupos homogéneos a los ensayos realizados con medio YM líquido y YM modificado (Anexo D).

Tabla 4. Análisis de Varianza para el mejor medio de cultivo.

Fuentes	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado de medias	F-Ratio	P- valor
Between groups	81,1566	2	40,5783	69,50	0,0001
Within groups	3,50302	6	0,583837		
Total (Corr.)	84,6596	8			

Teóricamente el medio de cultivo YM modificado con melaza, esta formulado con 30 g/L de melaza y de acuerdo con el DNS realizado para las fermentaciones preliminares (Figura 8), la concentración inicial fue 1.43 veces mayor. La causa puede deberse a que la melaza no es un compuesto homogéneo producto de su alta viscosidad y a la presencia de diferentes azúcares como la sacarosa, glucosa y fructosa (Jaramillo y Millán, 2005). La sacarosa puede sufrir una hidrólisis pasando de ser azúcar no reductor a reductor, este último reconocido por la técnica de empleada para la determinación del consumo de sustrato. Sin embargo, esto permite concluir que a una concentración inicial entre 30 y 40 g/L de melaza es posible obtener un crecimiento celular adecuado de las levaduras nativas estudiadas, *Saccharomyces* spp..

4.1.2 Fermentaciones en frascos agitados

Los resultados obtenidos en las fermentaciones fueron reproducibles, sin embargo, solo se muestran las fermentaciones de cada ensayo que presentaron un mejor

desempeño en cuanto a la producción de biomasa a los diferentes pHs y agitaciones. Los valores presentados para representar el consumo de sustrato, el comportamiento del pH y los parámetros cinéticos son los correspondientes a estas mismas fermentaciones.

4.1.2.1 Producción de biomasa y consumo de sustrato.

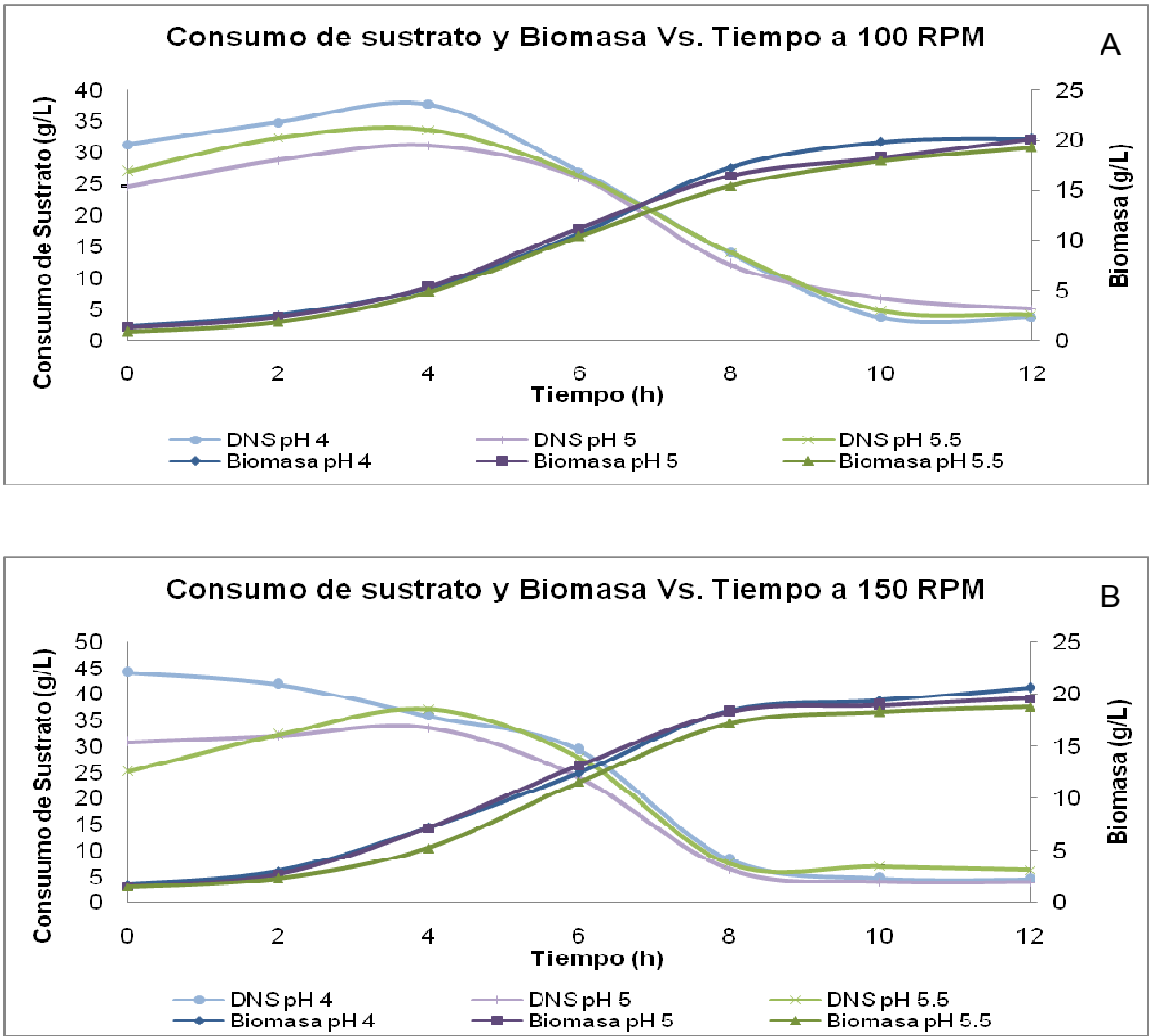
La cinética de crecimiento y consumo de sustrato de *Saccharomyces* spp. en medio YM modificado con melaza a diferentes agitaciones y pH en frascos agitados, se pueden observar en las figuras 10 A-C. La producción de biomasa y consumo de sustrato se cuantificaron en g/L (Anexo E).

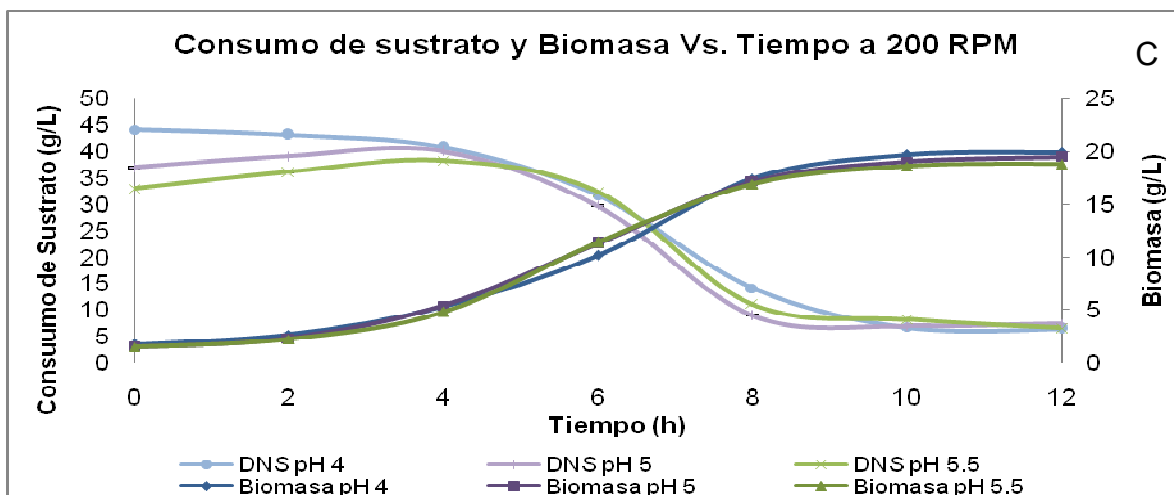
Los cultivos batch que se llevaron a cabo en frascos agitados, iniciaron con un inóculo correspondiente al 10 % del volumen total de trabajo de elevada actividad, es decir en el período exponencial de crecimiento. Con esto último se pretendió minimizar el tiempo total de la fermentación, motivo por el cual, las curvas independientes de biomasa (figuras 10 A-C) mostraron una fase de latencia de 1 hora aproximadamente, al cabo de la cual el microorganismo se encontró adaptado a su medio de cultivo. Posteriormente el microorganismo inició la fase de crecimiento exponencial, la cual tuvo una duración de 8 horas, y finalmente 4 horas de fase estacionaria.

La evolución del consumo de sustrato durante el desarrollo de cada fermentación se debió a la disminución en la concentración inicial de azúcares reductores, principalmente glucosa, y resultó consistente con la aparición de la fase estacionaria en las curvas de crecimiento. Durante la fase de latencia no se observó un consumo de sustrato apreciable, mientras que en la fase exponencial se consumió el sustrato hasta llegar a la fase estacionaria (Anexo E).

Debido al consumo de la fuente de carbono demandada por el microorganismo, la concentración de azúcares disminuyó en un 70% aproximadamente. A partir de este punto el microorganismo cesó su crecimiento probablemente por múltiples factores: disminución del pH, agotamiento de los nutrientes, inhibición por producto o alta concentración celular y por ende poca disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo.

Figura 10. Producción de biomasa y consumo de sustrato (A) 100 RPM, (B) 150 RPM y (C) 200 RPM.





Aunque las fermentaciones en frascos agitados presentaron comportamientos reproducibles, la única diferencia, se debió a la variación en concentración de biomasa en la fase estacionaria, sin embargo esta variación fue tan baja que estos valores no presentaron una diferencia significativa. De una concentración inicial de alrededor de 1,7 g/L es posible obtener aproximadamente 20 g/L bajo las mejores condiciones de agitación y pH, es decir a pH inicial de 4 y 200 RPM. Estos resultados son confiables ya que de los errores estándar presentaron valores muy pequeños.

Cabe anotar, que a pesar de que el medio de cultivo se preparó de la misma forma, su posterior esterilización posiblemente provocó un ligero aumento en la concentración de azúcares reductores. La melaza es una fuente de carbono con diferentes azúcares entre los que se encuentran la sacarosa, glucosa y fructosa (Jaramillo y Millán, 2005), y parte de la sacarosa pudo sufrir una hidrólisis pasando de ser azúcar no reductor a reductor. Estos azúcares reductores son reconocidos por la técnica de DNS empleada para la determinación del consumo de sustrato. Una de las principales variables para la regulación del metabolismo de las levaduras bajo diferentes condiciones nutricionales es la concentración de glucosa (Frick y Wittmann, 2005).

Debido a que la fase estacionaria se presentó únicamente durante las 3 últimas horas de fermentación, la producción de biomasa máxima se tomó como el promedio de los valores pertenecientes a las 2 últimas horas de fermentación (10 y 12 h) (Tabla 5). Para comprobar la variabilidad de los datos se utilizó la prueba de Bartlett's, que arrojó un P- valor superior a 0.05, indicando que el análisis de varianza es válido debido a que hay homogeneidad en los datos. Posteriormente se realizó la prueba multifactorial ANOVA para 2 factores, el pH y la agitación (Tabla 6).

Tabla 5. Promedio de la fase estacionaria de las fermentaciones que presentaron la mayor producción de biomasa en cada ensayo.

pH	RPM	Biomasa (g/L)		
		100 RPM	150 RPM	200 RPM
4		18,8426	18,8083	19,2890
4		18,4606	18,8941	18,6108
4		19,9544	20,0059	19,8170
5		17,6021	18,6108	19,2504
5		18,7911	19,1131	18,8040
5		19,1774	19,2547	18,8040
5,5		16,7822	17,9670	18,3533
5,5		18,0657	18,5250	18,6838
5,5		18,6237	18,1472	17,7824

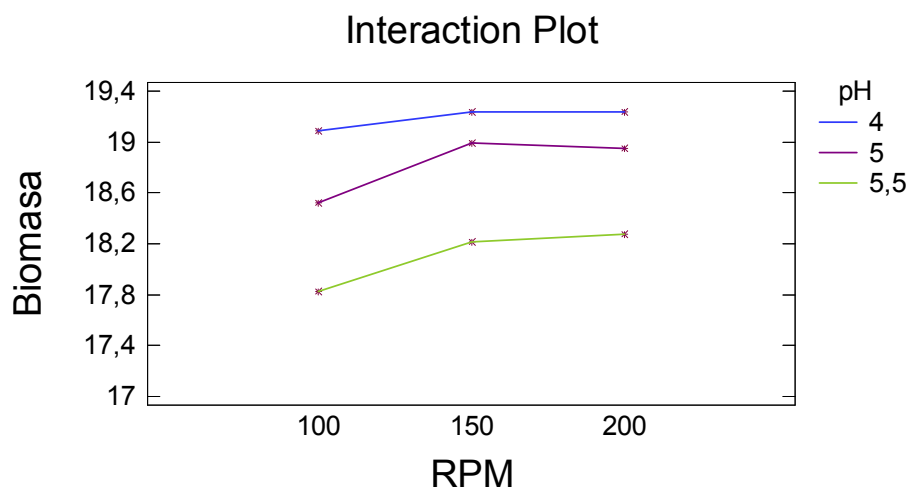
Tabla 6. Análisis de varianza para la Producción de Biomasa

Fuentes	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado de medias	F-Ratio	P- valor
EFECTO DE LAS MEDIAS					
A:pH	5,47374	2	2,73687	7,14	0,0052
B:RPM	0,694133	2	0,347067	0,91	0,4220
INTERACCIONES					
AB	0,114982	4	0,0287455	0,07	0,9889
RESIDUAL	6,89965	18	0,383314		
TOTAL (corregido)	13,1825	26			

De acuerdo con el análisis de varianza, es posible concluir que la producción de biomasa en las fermentaciones depende únicamente del pH, mientras que la variación de las revoluciones no produce un efecto significativo en la variable de respuesta de interés. Adicionalmente, no hay interacción entre el pH y RPM, esto puede observarse claramente en la figura 11, y al P- valor (> 0.05) arrojado por el análisis estadístico. A pH constante y un aumento de 100 a 150 RPM se logra un leve incremento en la producción de biomasa principalmente a pH 4 y 5, mientras que cuando se realiza una variación de 150 a 200 RPM, las modificaciones en la biomasa son casi cero en todos los casos. Esto se comprobó realizando una prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls que consiste en un procedimiento de comparación múltiple para determinar que tratamientos presentan diferencias significativas con respecto a los demás, o cuáles de ellos son homogéneos.

Esta prueba (Anexo E) indica que las fermentaciones realizadas a pH inicial de 4 y 5 son grupos homogéneos es decir que los resultados obtenidos con respecto a la biomasa no presentan diferencias significativas, a diferencia de las obtenidas a pH 5.5. Con respecto a las RPM, las diferencias son tan poco significativas que todos los tratamientos presentan homogeneidad

Figura 11. Interacciones entre el pH y las RPM teniendo como variable de respuesta la producción de biomasa.



En la tabla 7 se muestran los valores arrojados por el análisis estadístico, de la cual puede decirse que la mayor cantidad de biomasa se obtiene a pH 4 con una cantidad de 19,187 g/L y a 200 RPM con 18,8216 g/L, y que a su vez esta es la mejor combinación, donde es posible producir 19,2389 g/L de células de levadura nativa. Adicionalmente, puede observarse que el valor del error estándar es pequeño, lo cual indica que no hay diferencias relevantes entre los datos experimentales.

Tabla 7. Medias y error estándar para la producción de biomasa con un intervalo de confianza del 95%.

Nivel		Cantidad	Medias	Error Estándar
GRAND MEAN		27	18,7045	
pH				
4		9	19,1870	0,206375
5		9	18,8231	0,206375
5,5		9	18,1034	0,206375
RPM				
100		9	18,4778	0,206375
150		9	18,8140	0,206375
200		9	18,8216	0,206375
pH by RPM				
4	100	3	19,0859	0,357451
4	150	3	19,2361	0,357451
4	200	3	19,2389	0,357451
5	100	3	18,5235	0,357451
5	150	3	18,9929	0,357451
5	200	3	18,9528	0,357451
5,5	100	3	17,8239	0,357451
5,5	150	3	18,2131	0,357451
5,5	200	3	18,2732	0,357451

A través de los años, se han realizado múltiples estudios con levaduras con fines diferentes. Sobre la producción de biomasa con *S. cerevisiae* existen muchas investigaciones. Entre ellas se encuentra aquella realizada por Beck *et al.*, (1968), quienes cultivaron *S. cerevisiae* LBGH 1022 en sistema batch y continuo a diferentes concentraciones de glucosa, en un medio sintético a pH 5.5, 30 °C, 900 RPM y 0,5 vvm obteniendo alrededor de 3 y 4,2 g/L respectivamente.

En la investigación realizada por Hensirisak (1997), se obtuvo una concentración máxima de 3.5 g/L de *S. cerevisiae* ATCC 4111 en medio YM líquido en un cultivo

batch, a 35 °C, pH 6, 600 RPM y un aireador dispersador de microburbujas (Microbubble dispersión-MBD). Como una continuación de este trabajo, Parakulsuksatid (2000), realizó fermentaciones batch con la misma cepa, sistema de aireación, pH y temperatura en un Bioflo III con un volumen de trabajo de 1 L y 476 RPM y se obtuvo una producción máxima de biomasa de alrededor 6 g/L.

Adicionalmente Rudolf *et al.* (2000), llevaron a cabo fermentaciones de 2 cepas de levaduras comerciales: “azul” y “roja”, a pH 5 y 30 °C en un medio de cultivo compuesto por glucosa, trazas de metales, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 y MgSO_4 . El proceso se llevó a cabo en dos etapas: la primera parte se realizó en condiciones batch donde al transcurrir 40 h se obtuvo alrededor de 12 g/L de biomasa con rendimientos de sustrato en biomasa de 0.30 ± 0.02 g/g y 0.26 ± 0.02 g/g respectivamente; y en la segunda el proceso fue fed-batch y tardo 25 h al cabo de las cuales fue posible alcanzar una biomasa de 65 g/L con $Y_{x/s}$ de 0.46 ± 0.02 g/g y 0.48 ± 0.01 g/g respectivamente. Los valores aproximados para las velocidades específicas de crecimiento durante la fase de crecimiento exponencial, fueron de $0.10\text{-}0.12 \text{ h}^{-1}$ para la azul y de $0.08\text{-}0.11 \text{ h}^{-1}$ para la roja.

De otro lado, Manovacia y Moreno (2005) quienes realizaron fermentaciones batch en frascos agitados y trabajaron con la misma cepa y medio de cultivo utilizados en esta investigación, a pH 4,5, 25 °C y 150 RPM durante 24 horas obtuvieron una producción de biomasa de 4,76 mg/mL.

Con una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* SU50 Calado *et al.*, (2003), realizaron fermentaciones batch y fed-batch en frascos agitados a pH 6, 30°C y 200 RPM en medios compuestos por glucosa, galactosa, extracto de levadura y peptona, y en biorreactor a las mismas condiciones de temperatura, agitación, pH y con 1,1 vvm de aireación variando las concentraciones de glucosa y galactosa en el medio de cultivo. Para las fermentaciones batch en frascos agitados

se obtuvo alrededor de 12 g/L de biomasa a una concentración de 40 g/L de galactosa, con un rendimiento de 0.30 g biomasa/g fuente de C y una μ_{\max} de 0.025 h⁻¹; a una concentración de 20 g/L de glucosa con 25 g/L de galactosa en biorreactor se produjo cerca de 25 g/L de biomasa con rendimientos de 0.26 g biomasa/g de glucosa y 0.50 g biomasa/g de galactosa y velocidades específicas de crecimiento de 0.39 y 0.058 h⁻¹ en glucosa y galactosa respectivamente, mientras que en la fermentación fed-batch precedida de una fase batch se alcanzó aproximadamente 36 g/L de biomasa a una concentración de 20 g/L de glucosa y galactosa.

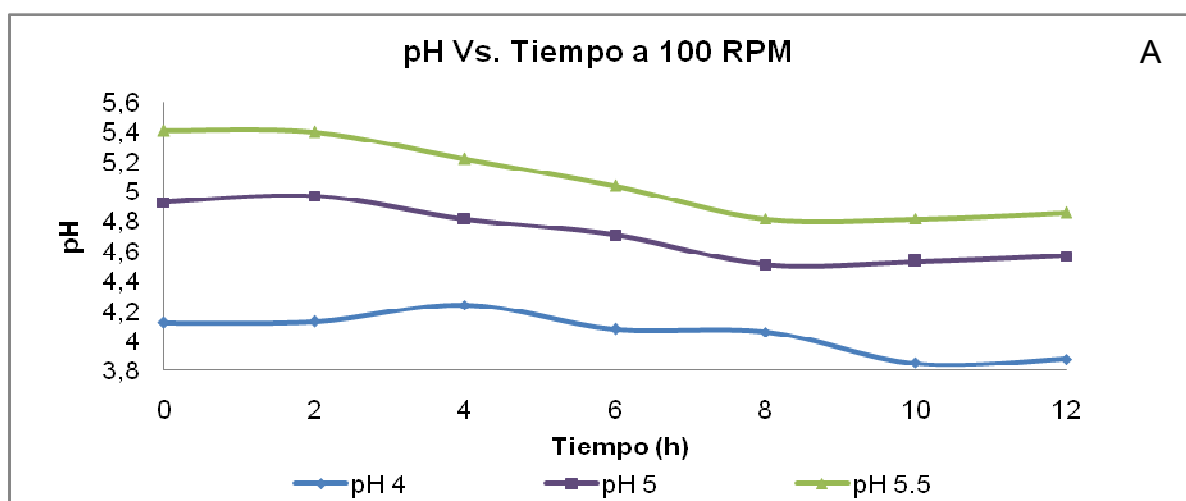
De otro lado Llano (2006) quien utilizó el mismo biorreactor que se empleó en este estudio, trabajó con levaduras comerciales *Saccharomyces cerevisiae* y llevó a cabo fermentaciones de 2 L en un medio de cultivo compuesto por melaza y urea a pH inicial 6, 30°C, 200 RPM y 1vvm, de donde se obtuvo 4.741 g/L de biomasa, un rendimiento de 0.1077 g/g y una velocidad máxima de crecimiento específico de 0.0927 h⁻¹.

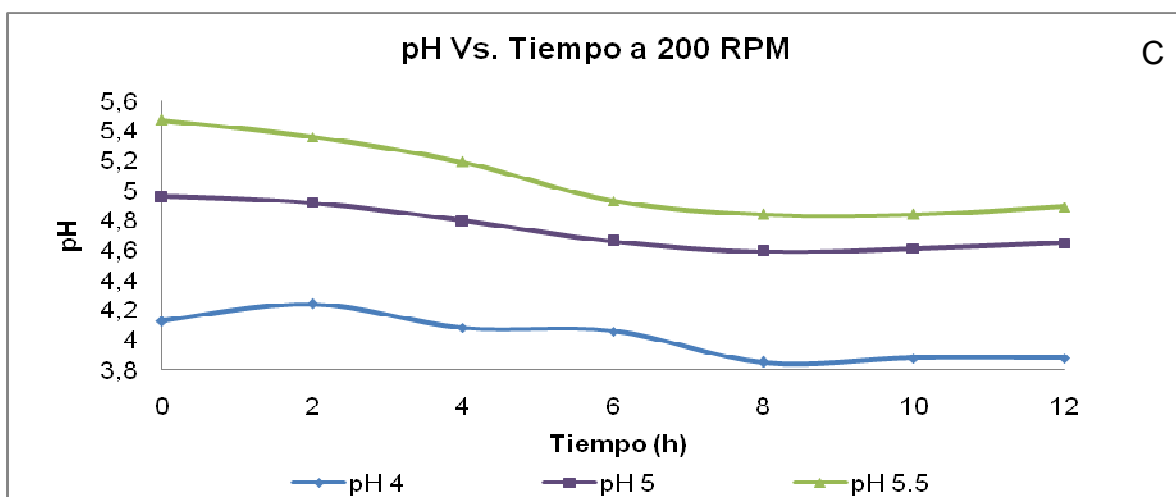
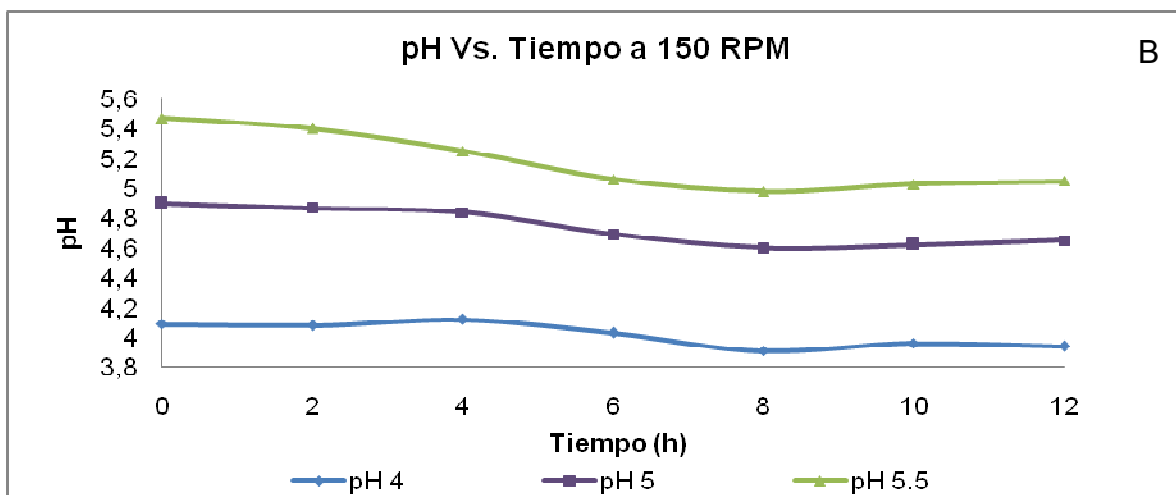
De lo anterior, puede decirse que aunque cada microorganismo presenta una actividad biológica diferente, las levaduras nativas estudiadas contaron con los nutrientes y cantidades adecuadas que permitieron satisfacer las necesidades del microorganismo demostrando el alto potencial que posee para la producción de biomasa. Generalmente la producción de biomasa de este tipo de microorganismos se realiza a nivel industrial mediante fermentaciones fed batch, donde para optimizar la producción de biomasa se requieren altas velocidades de crecimiento específica y rendimientos de biomasa (Hoek *et al.*, 1998).

4.1.2.2 Comportamiento del pH

El pH es un factor fundamental en la producción de biomasa de levaduras, debido a que durante el crecimiento a causa de las reacciones metabólicas se consumen o producen sustancias que generalmente acidifican el medio, en ocasiones hasta alcanzar una inhibición por pH. Por lo anterior, es un parámetro importante que debe monitorearse durante las fermentaciones. En las Figuras 12 A-C se presentan los resultados para las curvas que presentaron un mejor desempeño de todas las estudiadas a todas las combinaciones y durante todo el tiempo de la fermentación. En general, puede observarse que al aumentar el tiempo de fermentación y biomasa celular, se produce un descenso en el pH, que es más marcado en las fermentaciones que iniciaban en el mayor pH (pH 5.5). Este comportamiento es normal, ya que de acuerdo con Vicente *et al.*, (1997) en fermentaciones de levaduras, la actividad metabólica es la causa principal del intercambio de protones en el medio y la cantidad de ácido o base consumidos se debe a la asimilación del nitrógeno bajo condiciones respiratorias, mientras que la producción de etanol no contribuye significativamente a la producción de protones.

Figura 12. Comportamiento del pH durante las fermentaciones (A) 100 RPM, (B) 150 RPM, (C) 200 RPM.





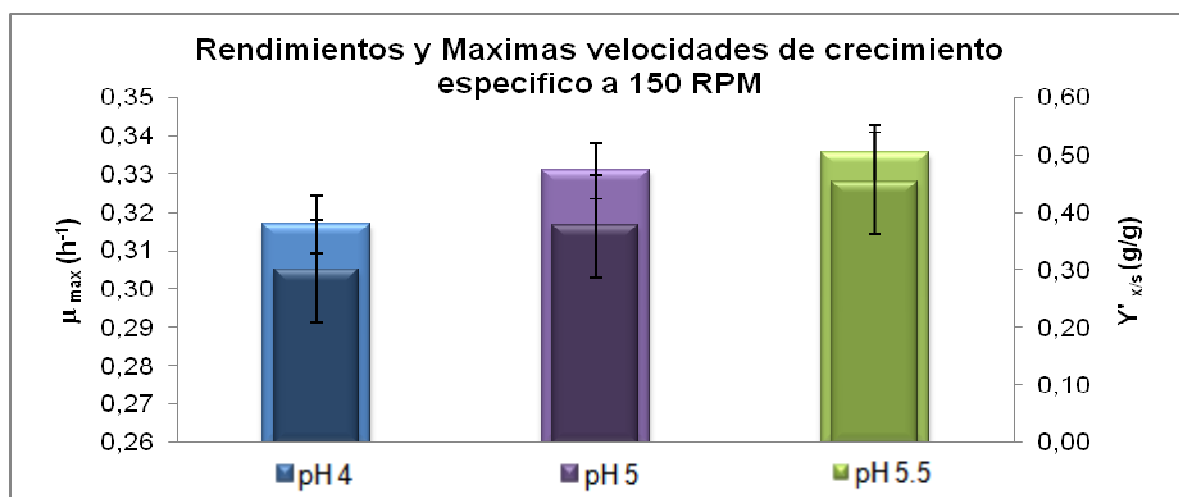
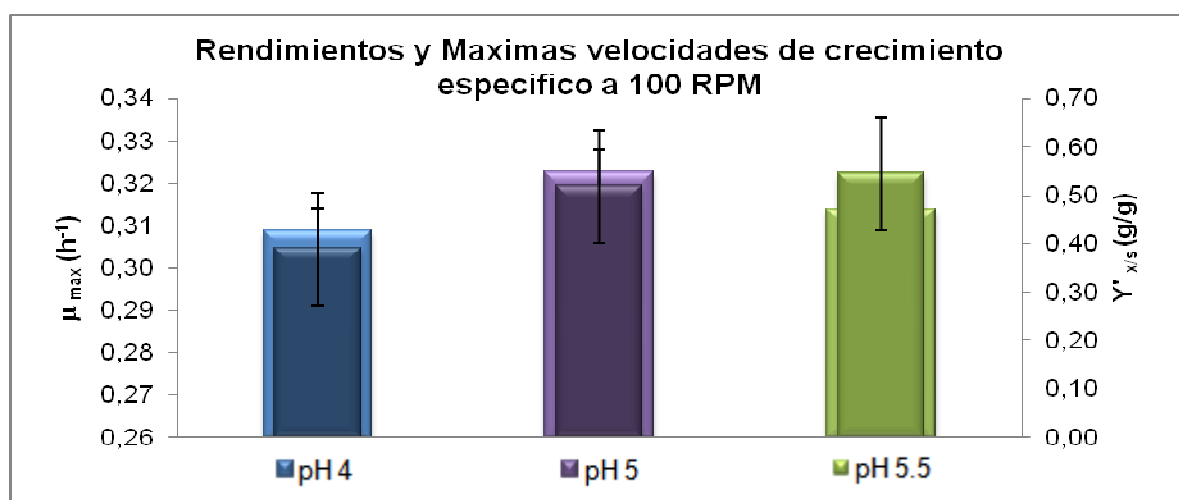
4.1.2.3 Parámetros cinéticos

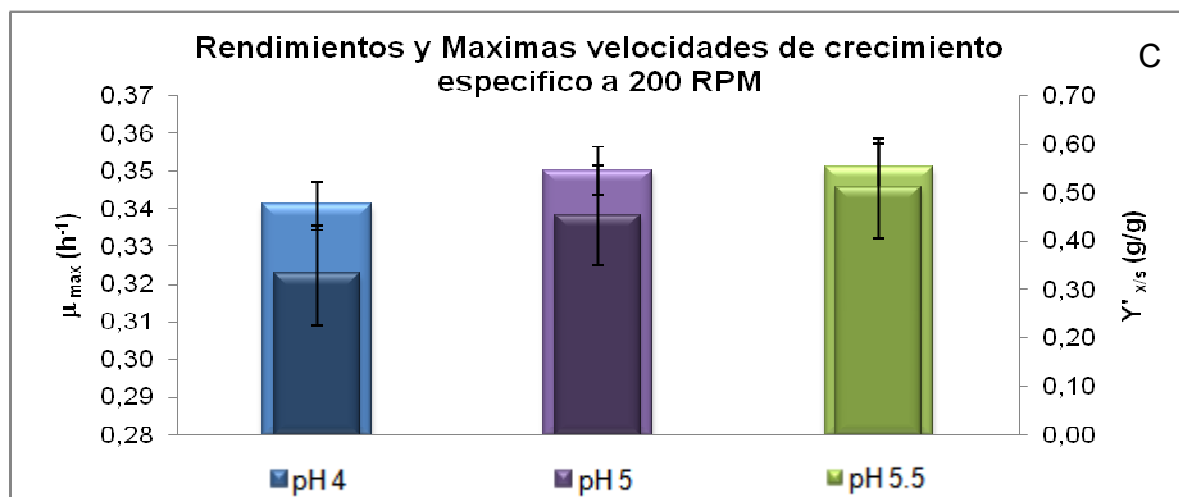
Los rendimientos y la máxima velocidad de crecimiento específico son parámetros importantes que permiten conocer mejor el sistema estudiado. Los rendimientos dan una guía sobre la factibilidad económica del proceso, debido a que la producción de biomasa dependen principalmente del costo de la materia prima y un microorganismo con un elevado rendimiento de sustrato en biomasa favorece la productividad del proceso, disminuyendo el costo por remoción de calor (Duarte, 1998). Adicionalmente, la velocidad específica de crecimiento, se constituye en una medida de la concentración del sistema enzimático responsable de la transformación del sustrato durante la fase exponencial de crecimiento del microorganismo (Duarte,

1998). Por lo anterior, se determinaron los rendimientos observados de sustrato en biomasa ($Y'_{x/s}$) y la máxima velocidad de crecimiento específico (μ_{\max}) de las curvas que tuvieron el mejor comportamiento para cada ensayo, (Anexo F). A partir de estos resultados se realizó un análisis estadístico para cada parámetro.

En las figuras 13 A-C, se presenta el promedio de las medias de los mejores ensayos realizados para todos los pHs y agitaciones estudiadas. Las barras de colores oscuros corresponden al promedio de los μ_{\max} (eje izquierdo) y los claros pertenecen a los rendimientos esperados (eje derecho).

Figura 13. Parámetros cinéticos para las fermentaciones (A) 100 RPM, (B) 150 RPM, (C) 200 RPM.





Se realizó la prueba de Bartlett's para comprobar la variabilidad de los datos, que arrojó un P- valor superior a 0.05, indicando que el análisis de varianza es válido debido a que hay homogeneidad en los datos. Posteriormente se utilizó la prueba multifactorial ANOVA para 2 factores, el pH y la agitación. En la tabla 8 y 9 se muestran los resultados para los rendimientos de biomasa en sustrato observados ($Y'_{x/s}$) y la máxima velocidad de crecimiento específico (μ_{max}), respectivamente.

De acuerdo con los resultados arrojados por el análisis estadístico, puede observarse que tanto para los rendimientos observados como para la máxima velocidad de crecimiento específica, los factores estudiados no afectan significativamente los parámetros cinéticos y no hay interacción entre ellos (Figuras 14 y 15), lo que indica que cualquier combinación es válida. Esto se comprobó realizando pruebas de rango múltiple para cada factor y para los dos parámetros cinéticos, que presentaron homogeneidad en los grupos estudiados (Anexo F).

Tabla 8. Análisis de varianza para $Y' \frac{y}{s}$

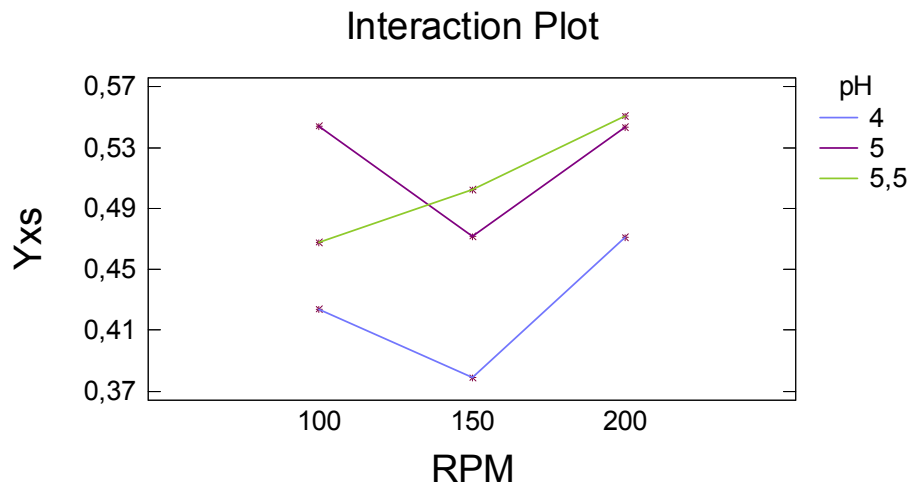
Fuentes	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado de medias	F-Ratio	P- valor
EFECTO DE LAS MEDIAS					
A:pH	0,0230423	2	0,0115211	1,57	0,2357
B:RPM	0,048155	2	0,0240775	3,28	0,0612
INTERACCIONES					
AB	0,0106555	4	0,00266387	0,36	0,8321
RESIDUAL	0,132293	18	0,00734963		
TOTAL (corregido)	0,214146	26			

Tabla 9. Análisis de varianza para μ_{\max}

Fuentes	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado de medias	F-Ratio	P- valor
EFECTO DE LAS MEDIAS					
A:pH	0,00209563	2	0,00104781	1,99	0,1661
B:RPM	0,00230007	2	0,00115004	2,18	0,1419
INTERACCIONES					
AB	0,0000623704	4	0,0000155926	0,03	0,9981
RESIDUAL	0,009494	18	0,000527444		
TOTAL (corregido)	0,0139521	26			

En la figura 14, se puede observar que un aumento de las revoluciones de 100 a 150 RPM produce, en el caso de los pHs 4 y 5, una disminución en los rendimientos observados, mientras que a pH 5.5 hay un aumento. Cuando el cambio de las revoluciones se da de 150 a 200 RPM, se observa un comportamiento similar para todos los pHs estudiados, los rendimientos aumentan. Contrario a lo que sucede en el caso de la biomasa, donde de 100 a 150 aumenta y de 150 a 200, permanece casi constante para todos los pHs.

Figura 14. Interacciones entre el pH y las RPM teniendo como variable de respuesta $Y' \frac{x}{s}$.



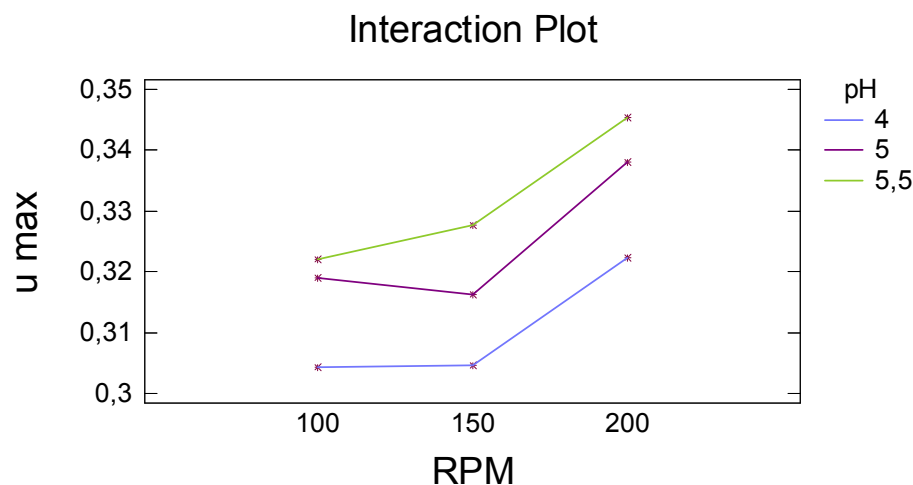
La prueba de las medias (figura 13 A-C) (Anexo F) para los rendimientos observados arroja que a pH 5 y agitación de 200 rpm se obtienen los mayores rendimientos, con valores de medias de 0.519889 y 0.521889 g biomasa/g sustrato, respectivamente, pero que la mejor combinación es pH 5.5 y 200 RPM, con la cual se obtuvo el mejor rendimiento con una media de 0,550667 g biomasa/g sustrato.

Según Verduyn *et al.*, (1991), un rendimiento de 0.49 g biomasa/g glucosa que se encuentra a velocidades específicas de crecimiento (o tasas de dilución para cultivos en quimiostato) entre 0.10 y 0.25 h⁻¹ es un valor típico para cultivos respirativos de *S. cerevisiae*. Una ligera disminución es probablemente debido a un incremento en la contribución de energía de mantenimiento requerida por todos los procesos (Pirt, 1965). Esta puede ser una de las razones por las cuales la combinación que arrojó la mejor producción de biomasa correspondiente a pH 4 y 200 RPM, no fue la misma que presentó el mayor rendimiento observado.

De la figura 15, se puede decir que a pH 4 y 5.5 el cambio de 100 a 150 RPM implica un leve aumento en la máxima velocidad de crecimiento específica, mientras que a pH 5, lo que se observa es una pequeña disminución de este parámetro; a diferencia del comportamiento que se presenta para todos los pHs cuando las revoluciones aumentan de 150 a 200 RPM, ya que hay un incremento de la máxima velocidad de crecimiento específica, aunque los valores no presente una variación muy significativa. El comportamiento de la biomasa en cambio es totalmente contrario a la de μ_{\max} , donde la mayor variación se da de 100 a 150 RPM. En general, es posible afirmar, que a mayor agitación y pH fue posible obtener un μ_{\max} mayor.

Figura 15. Interacciones entre el pH y las RPM teniendo como variable de respuesta

μ_{\max} .



Aunque la velocidad específica de crecimiento máxima μ_{\max} presentó, para todas las combinaciones estudiadas, valores homogéneos, la prueba de las medias (figuras 13 A-C) (Anexo F) arrojó que el mejor pH es 5.5 y la mejor agitación 200 RPM con μ_{\max} de 0.331667 h^{-1} y 0.335222 h^{-1} , respectivamente, y a su vez esta es la mejor

combinación con una media de 0.345333 h^{-1} . Todas las medias se calcularon con un intervalo de confianza del 95%.

A velocidades de crecimiento específicas cercanas a 0.20 h^{-1} Frick *et al.*, (2005) determinaron que el metabolismo de *S. cerevisiae* es totalmente oxidativo, indicando la ausencia de productos de la fermentación y un alto rendimiento de biomasa. A valores mayores se favorece la formación de etanol y acetato. Para una $\mu = 0.30 \text{ h}^{-1}$ cerca del 25 % de la glucosa se utiliza en fermentación, indicando que el metabolismo sigue siendo principalmente respirativo, mientras que a velocidades superiores una cantidad mayor de glucosa se involucra en vías fermentativas. Esto permite concluir que en los ensayos realizados tanto a nivel de frascos agitados como en el biorreactor, donde las velocidades máximas de crecimiento específicas están alrededor de 0.3 h^{-1} , se presentaron fermentaciones principalmente respirativas que favorecen la producción de biomasa aunque no se evitó la producción de subproductos principalmente etanol, que se puede afirmar debido al olor característico que presentaban las fermentaciones. Este análisis concuerda con la combinación, que de acuerdo con el análisis estadístico, presentó la mayor velocidad de crecimiento específico, es decir a pH 5.5 y 200 RPM, que al mismo tiempo es el pH al cual se presenta la menor producción de biomasa, siendo el grupo de datos no homogéneos en relación a los otros pH estudiados. Para optimizar el perfil de la velocidad específica de crecimiento, es necesario conocer la relación entre la velocidad de crecimiento específica y la capacidad fermentativa del microorganismo (Hoek *et al.*, 1998).

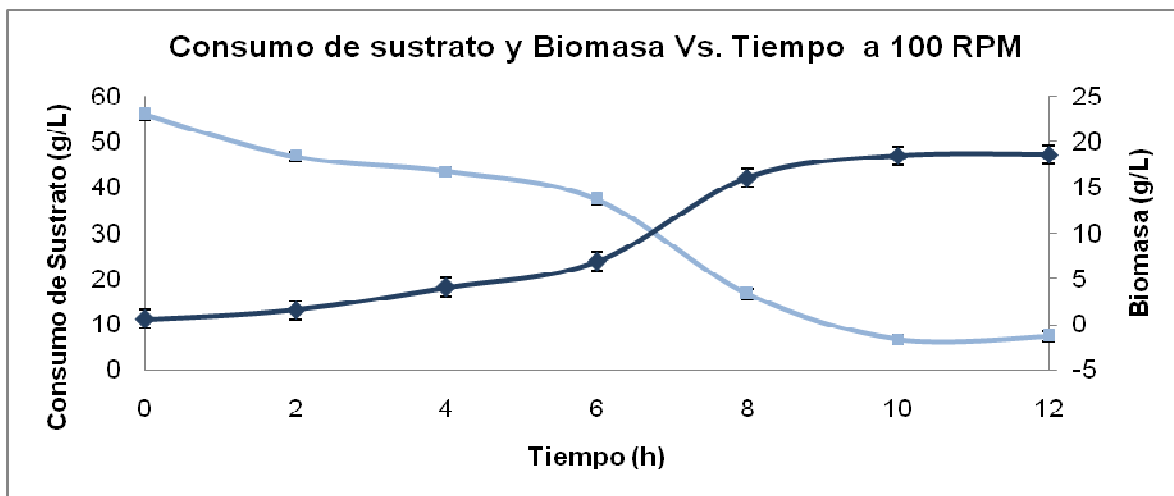
En cultivos batch como los estudiados, la máxima velocidad de crecimiento específica de una cepa de levadura de panadería industrial DS28911 en un medio definido con glucosa, minerales y vitaminas fue de $\mu = 0.42 \text{ h}^{-1}$ (Hoek *et al.*, 1998) lo que indica que los valores obtenidos en los sistemas estudiados no se alejan mucho de este valor.

Al realizar una comparación con las fermentaciones batch reportados por Rudolf *et al.*, (2000) y Calado *et al.*, (2003) quienes lograron un rendimiento 0.30 ± 0.02 g/g con una $\mu_{\max} = 0.10\text{-}0.12$ h⁻¹ y 0.30 g biomasa/g fuente de C con una μ de 0.025 h⁻¹, respectivamente (ver numeral 4.1.2.1); puede decirse que tanto los rendimientos observados como las velocidades máximas de crecimiento específico halladas en esta investigación están por encima de los valores reportados por los autores mencionados. Así mismo, la cantidad de biomasa producida por las levaduras nativas *Saccharomyces* spp. fue superior, ya que se obtuvo alrededor de 1,7 veces más biomasa que la producida por Rudolf *et al.*, (2000) y Calado *et al.*, (2003), quienes bajo condiciones diferentes alcanzaron 12 g/L de biomasa al final de la fermentación.

4.1.3 Fermentaciones en Biorreactor.

Después de realizar las fermentaciones en frascos agitados para diferentes niveles de pH y agitación, y determinar las mejores condiciones para las cuales se obtuvo una mayor cantidad de biomasa, se procedió a calcular el k_La para estas condiciones y se utilizó como criterio de escalamiento. Las fermentaciones en biorreactor de 2 L que se operaron a 1vvm, 150 RPM, 28 °C y pH 4. En el numeral 3.4.2 de este capítulo se describe detalladamente cuales fueron los pasos a seguir para realizar el escalamiento. En la figura 16, se muestra el promedio de los datos con sus respectivos errores para la producción de biomasa y consumo de sustrato cuantificados en g/L. Estas fermentaciones en biorreactor presentaron un comportamiento análogo a los frascos agitados, aunque se puede notar que la biomasa al final de la fermentación fue de 18.6065 g/L, levemente menor a la que se obtuvo a en la etapa anterior de 19.9286 g/L. Sin embargo, estos valores presentan diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05) lo que puede deberse principalmente al cambio de escala y más específicamente a la transferencia de masa dentro del sistema (Anexo G).

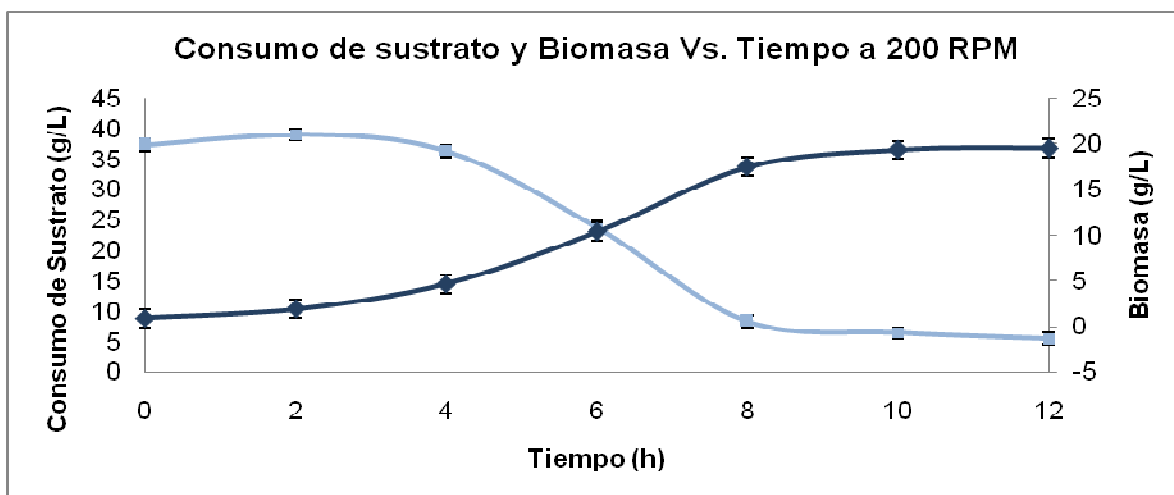
Figura 16. Producción de biomasa y consumo de sustrato en biorreactor de 2 L de trabajo, pH 4, 150 RPM, 1vvm y 28°C. Barras verticales: error estándar.



En el trabajo realizado por Parakulsuksatid (2000), se concluyó que la agitación es más relevante para la producción de biomasa de levaduras que la aireación, debido a que una buena agitación permite la dispersión de las burbujas al medio durante un tiempo de residencia largo. Un aumento en la velocidad de agitación, incrementa la dispersión del gas en el medio de cultivo. Por lo tanto se decidió realizar una nueva fermentación en el biorreactor a las mismas condiciones de aireación, pH y temperatura pero para una agitación de 200 RPM, análoga a la empleada en la escala anterior de frascos agitados (Anexo G).

En la figura 17, se muestra el promedio de los datos con sus respectivos errores para la producción de biomasa y consumo de sustrato cuantificados en g/L, a partir de la cual es posible afirmar que bajo estas condiciones la cantidad de biomasa al final de la fermentación es de 19.4822 g/L, más cercana a la que se obtuvo a nivel de frascos agitados (19.9286 g/L). Sin embargo, estos valores tienen diferencias muy poco significativas (P - valor > 0.05), probablemente debido a que el oxígeno disuelto en los dos sistemas se encontraba cerca del valor crítico y una alta cantidad de sustrato se consumió (Parakulsuksatid, 2000).

Figura 17. Producción de biomasa y consumo de sustrato en biorreactor de 2 L de trabajo, pH 4, 200 RPM, 1vvm y 28°C. Barras verticales: error estándar.



La tasa máxima de crecimiento específico en las fermentaciones realizadas a 150 RPM y 200 RPM fue la misma con un valor de $0,528 \text{ h}^{-1}$, al igual que los rendimientos presentaron valores de $0,372 \text{ g biomasa/g sustrato}$. Se ha demostrado que cerca del valor crítico de oxígeno disuelto, la tasa específica de crecimiento de los microorganismo aeróbicos es constante (Shuler y Kargi, 1992). Lo que comprueba que la mayor diferencia que se presenta entre los experimentos realizados en el fermentador a diferentes agitaciones, es debida a la dispersión del oxígeno en el medio de cultivo que provoca un incremento en la concentración de oxígeno disuelto que se traduce en un leve aumento de la concentración celular.

4.2 ESCALAMIENTO DEL PROCESO

4.2.1 Desde frascos agitados hasta biorreactor.

Debido a que la potencia que un agitador orbital entrega a un erlenmeyer es diferente a la que un impeler entrega al medio de cultivo en un biorreactor, no es correcto utilizar las mismas condiciones de agitación para los dos sistemas, por lo

tanto es necesario adoptar un método de escalamiento para determinar cuáles deben ser las condiciones en el biorreactor de acuerdo con las mejores obtenidas a nivel de frascos agitados. Para esta etapa se utilizó la ecuación desarrollada por Maier *et al.*, (2001), como se describe a continuación:

$$OTR_{\max} \approx n^{0,84} V_L^{-0,84} d_0^{0,27} d^{-1,25} \quad (7)$$

Donde:

OTR_{\max} :	Capacidad máxima de transferencia de oxígeno [mmol/L/h]
n :	Frecuencia de agitación [RPM]
V_L :	Volumen de llenado [mL]
d_0 :	Diámetro de agitación [cm]
d :	Diámetro mayor de los erlenmeyers [m]

Teóricamente, la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) que se encuentra afectada por la resistencia a la transferencia de oxígeno en la superficie gas-líquido entre la burbuja y el líquido está definida como:

$$OTR = k_L a (C^* - C) \quad (8)$$

Donde:

OTR :	Velocidad de transferencia de oxígeno
$k_L a$:	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
C^* :	Concentración de oxígeno disuelto en la fase frontera gas-líquido
C :	Concentración de oxígeno disuelto en el seno de la solución.

Suponiendo que todo el oxígeno disuelto en el medio es consumido por los microorganismos, la concentración de oxígeno disuelto C , se hace cero, así

igualando las ecuaciones 7 y 8, se puede calcular el $k_L a$ como se muestra en la ecuación 9:

$$k_L a \approx \frac{n^{0,84} V_L^{-0,84} d_0^{0,27} d^{-1,25}}{C^*} \quad (9)$$

A partir de los datos que se tienen para las fermentaciones en frascos agitados y teniendo la concentración de oxígeno en la interface gas-líquido que se encuentra reportada en la literatura, se puede determinar el valor del $k_L a$ para realizar el escalamiento. Los datos utilizados se muestran en la tabla 10:

Tabla 10. Datos obtenidos de las fermentaciones en frascos agitados para determinar el $k_L a$ a partir de la ecuación desarrollada por Maier *et al.*, (2001).

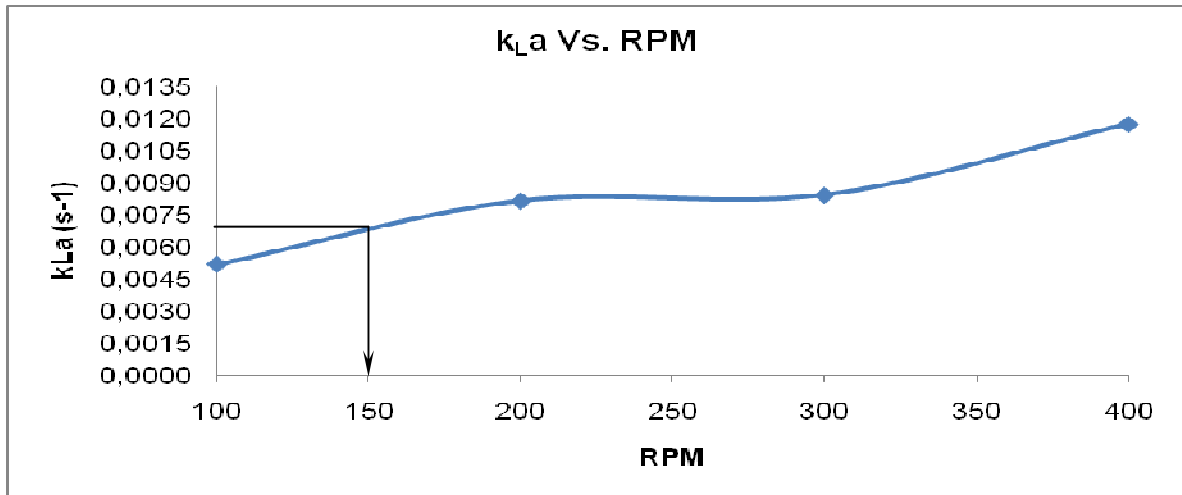
n (RPM)	200
V_L (mL)	250
d_0 (cm)	2.54
d (m)	0.1308
C^* (mmol/L)	0.5181 ¹

Al aplicar la ecuación 9 se determinó el $k_L a$, arrojando un valor de $7.2682 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. A partir de este valor y la figura 18 que muestra el comportamiento del $k_L a$ con respecto a diferentes revoluciones de agitación determinados mediante una caracterización del biorreactor BIOENGINEERING CH 8636 que se llevó a cabo realizando mediciones del $k_L a$ en 2 L de agua mediante el método dinámico para 4 agitaciones (100, 200, 300 y 400 RPM) y 1vvm de aireación (Villegas, 2006). Se utilizó una aproximación leyendo directamente en la gráfica para determinar cuáles

¹ Solubilidad del oxígeno en agua a 28 °C y 1 atm, Doran 1999.

eran las revoluciones a utilizar en el biorreactor que correspondieran al k_La encontrado en frascos agitados.

Figura 18. Caracterización de biorreactor BIOENGINEERING CH 8636



Así, se determinó que el fermentador debía trabajar a 150 RPM, 1 vvm y bajo las mismas condiciones de pH (pH 4) y temperatura trabajadas en la etapa anterior (28 °C).

4.2.2 Biorreactores

En esta etapa, se pretende realizar un escalamiento conceptual a escala de laboratorio escalando el volumen del líquido 50 veces desde un biorreactor con un volumen de trabajo de 2 L, a otro con un volumen de 100 L. Cabe anotar, que no fue posible mantener la similitud geométrica debido a que el biorreactor de 2 L utilizado BIOENGINEERING CH 8636 no conserva las relaciones geométricas reportadas en la literatura y sobre las cuales se basan las gráficas de potencia necesarias para el cálculo del k_La , aunque esto no se constituye en un problema, pues algunos autores como Quintero (1990), afirman que en la práctica es difícil mantener la geometría

para realizar un escalamiento basado en métodos de análisis dimensional y que algunos estudios han demostrado ventaja al escalar sin obedecer a la similitud geométrica.

El $k_L a$ que se constituye en el criterio de escalamiento tanto para la etapa anterior como para esta, es un parámetro determinante en la producción de biomasa de microorganismos aerobios como las levaduras. El valor experimental utilizado en esta etapa se determinó por triplicado mediante el método dinámico (Ver Anexo C) por Llano (2007), en una fermentación de levaduras *S. cerevisiae* comercial.

4.2.2.1 Determinación de los parámetros de escalado

A partir de las correlaciones reportadas en la literatura para calcular el $k_L a$, se seleccionó la de Van't Riet (1979), debido a que el valor que se obtiene con esta correlación se acerca más al $k_L a$ experimental. En la ecuación 10, se presenta la correlación de Van't Riet (Duarte, 1995):

$$k_L a = 0.026 \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.4} (v_s)^{0.5} \quad (10)$$

Donde:

$k_L a$:	Coficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
P_g :	Potencia gaseada
V :	Volumen del líquido
v_s :	Velocidad superficial del gas

Antes de realizar el escalado, es necesario conocer algunos datos de operación y de diseño del biorreactor utilizado, así como las propiedades del medio de cultivo y datos básicos de diseño de los biorreactores a utilizar en la escala siguiente. En las tablas 11, 12 y 13 se presenta esta información.

Tabla 11. Datos de operación y diseño del biorreactor de V=2 L.

D_t (m)	0.12
D_i (m)	0.045
H_i (m)	0.167
L_i (m)	0.015
W_i (m)	0.0122
W_b (m)	0.0457
N_b	4
n_i (RPM)	150
n_{is} (rps)	3.3333
FA (m³/s)	3.3333*10 ⁻⁵
V (m³)	2*10 ⁻³
W_i/ D_i	0.2711
D/ D_i	2.6667
H_i/ D_i	3.7111
v_s (m/s)	2.2760*10 ⁻³
k_La experimental (s⁻¹)	0.0071

Tabla 12. Propiedades del medio de cultivo para

Densidad, ρ (Kg/m³)	1,0242
Viscosidad, μ (P)	0,9645

Tabla 13. Datos de diseño de los biorreactores de 50L y 100L (Doran, 1999).

Parámetro	Biorreactor de 50 L	Biorreactor de 100 L
D_t (m)	0,3993	0,5031
D_i (m)	0,1331	0,1677
H_L (m)	0,3993	0,5031
H_i (m)	0,1331	0,1677
L_i (m)	0,0333	0,0419
W_i (m)	0,0266	0,0335
W_b (m)	0,0399	0,0503
N_b	4	4
H_i/D	1	1
D_i/D	0,3333	0,3333

Figura 19. Nomenclatura y dimensiones para un tanque agitado.

D_t : Diámetro interno del reactor

D_i : Diámetro del impulsor

H_L : Altura del líquido

H_i : Altura del fondo del reactor al impulsor

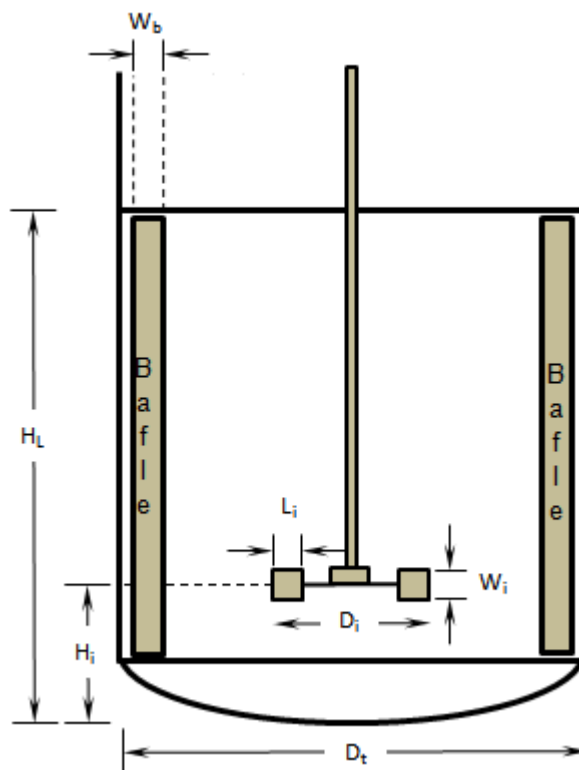
L_i : Ancho del impulsor

W_i : Alto del impulsor

W_b : Ancho del baffle

N_b : Número de baffles

Fuente: Doran, 1999



Conociendo toda la información necesaria, se procede a realizar el proceso de escalamiento, según como se plantea paso a paso en la tabla 14.

Tabla 14. Cálculos para realizar el escalamiento de los biorreactores.

1. Caudal del aire (FA)	$FA = n_i V$
2. Número de Reynolds (Re) (Doran, 1999)	$Re = \frac{n_{is} D_i^2 \rho}{\mu}$
3. Obtención y corrección del número de potencia (Np)	Debe utilizarse el gráfico que relaciona el número de potencia Vs. Reynolds. (Ver anexo H)
4. Potencia disipada por el impulsor sin aireación (Doran, 1999)	$P_0 = N_{pc} * \rho * n_{is}^3 * D_i^5$
5. Factor de corrección para 2 sets de impulsores (UNAL, 2006)	$P = P_0 * \sqrt{2}$
6. Número de aireación (Na)	$Na = \frac{FA}{D_i^3 * n_{is}}$
7. Relación entre la potencia gaseada y la no gaseada (Bailey, 1986)	$\frac{P_g}{P_0} = 0.35 + \frac{0.65}{1 + (16.67)Na}$
Determinación de los parámetros de operación (UNAL, 2006).	
G = reactor grande P = Reactor pequeño	
8. Velocidad de giro del impulsor (n_G)	$\frac{K_L a_G}{K_L a_P} = \frac{0.026 \left(\frac{P_G}{V_G} \right)^{0.4} (v_{sG})^{0.5}}{0.026 \left(\frac{P_P}{V_P} \right)^{0.4} (v_{sP})^{0.5}} = \left(\frac{n_G^3 D_{iG}^2}{n_P^3 D_{iP}^2} \right)^{0.4} \left(\frac{\frac{4}{\pi} n_G D_{iG}}{\frac{4}{\pi} n_P D_{iP}} \right)^{0.5}$ $\left(\frac{n_G}{n_P} \right) = \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}} \right)^{\frac{1.3}{1.7}}$

9. Caudal de aire (Q_G):

$$\left(\frac{Q_G}{Q_P}\right) = \left(\frac{n_G}{n_P}\right) \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^3$$

10. Volumen de aire por
volumen de medio por
minuto (vvm)

$$\frac{\left(\frac{Q}{V}\right)_G}{\left(\frac{Q}{V}\right)_P} = \frac{n_G}{n_P}$$

11. Potencia por unidad de
volumen

$$\frac{\left(\frac{P}{V}\right)_G}{\left(\frac{P}{V}\right)_P} = \left(\frac{n_G}{n_P}\right)^3 \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^2$$

12. Potencia

$$\frac{P_G}{P_P} = \left(\frac{n_G}{n_P}\right)^3 \left(\frac{D_{iG}}{D_{iP}}\right)^5$$

Para verificar si la correlación escogida para calcular el $k_L a$ es adecuada, se calculó con la ecuación 10 para las condiciones experimentales en el biorreactor de 2 L y se comparó con el dato obtenido experimentalmente. El porcentaje de error fue de $1.4552 \cdot 10^{-3}$, lo que corrobora que la correlación empleada representa de manera adecuada el sistema.

Como se observa en la tabla 15, para un $k_L a$ constante hay una disminución considerable en la velocidad de giro del impulsor al igual que en la aireación debida al aumento de la escala que implica un volumen y equipo de dimensiones mayores. De otro lado, el caudal de aire necesario es prácticamente el doble al trabajar a un volumen 50 veces mayor desde 2 L hasta 100 L.

Tabla 15. Parámetros de operación de los biorreactores.

Parámetro	Biorreactor de 2 L	Biorreactor de 50 L	Biorreactor de 100 L
$k_L a$ (s ⁻¹)	0.0071	0.0071	0.0071
Velocidad de giro (RPM)	200	88	74
Caudal de aire (m ³ /s)	3.33*10 ⁻⁵	3.67*10 ⁻⁴	6.15*10 ⁻⁴
vvm	1	0.44	0.37
Potencia (W)	0.0419	0.9560	2.1438
Potencia por unidad de volumen (W/m ³)	20.9671	19.1206	21.4384

A nivel industrial, las levaduras tipo *S. cerevisiae* se usan para la producción de etanol, proteínas recombinantes, antibióticos o biomasa, motivo por el cual es importante entender sus funciones metabólicas debido a que es capaz de presentar simultáneamente respiración y fermentación aunque se encuentre bajo condiciones totalmente aeróbicas (Frick y Wittmann, 2005). Por esta razón el $k_L a$, se constituye en el mejor criterio de escalamiento para el sistema estudiado, ya que está relacionado con el suministro de oxígeno, condición vital que favorece la producción de biomasa, donde la formación de subproductos de la fermentación es indeseable.

5. CONCLUSIONES

El tiempo de cultivo establecido durante las fermentaciones preliminares para la cepa nativa de levadura *Saccharomyces* spp. fue de 12 horas, al cabo de las cuales se obtuvo una concentración celular de 16 ± 2 g/L y un consumo de azúcares del 80 %, en frascos agitados a 150 RPM, 25 °C, 150 RPM y pH inicial 4.5.

El medio de cultivo en el que se presentó una mayor concentración celular fue en YM modificado con melaza, obteniéndose un 300 % más de biomasa, comparado con los medios YM líquido y YM modificado, sugeridos por Manovacía y Moreno (2005),

La producción de biomasa a partir de la levadura nativa *Saccharomyces* spp. a nivel de frascos agitados, depende significativamente del pH, mientras que el cambio en la agitación no es relevante, lo que puede deberse a múltiples factores, uno de ellos posiblemente debido a que los niveles estudiados no tuvieron una variación significativa como para tener un efecto en la variable de interés, ya que en este tipo de procesos la transferencia de oxígeno es relevante para la producción de los microorganismos.

Las mejores condiciones para una mayor producción de biomasa de *Saccharomyces* spp. Son: 28 °C de temperatura, pH 4 y 200 RPM en un biorreactor BIOENGINEERING CH 8636. Bajo estas condiciones se logra obtener una concentración máxima de 19.5 g/L en 12 horas, un rendimiento de sustrato en biomasa de 0,372 g biomasa/g sustrato y una velocidad específica de crecimiento máxima de $0,528 \text{ h}^{-1}$. Estos resultados demuestran el potencial de esta levadura para la producción de biomasa en comparación con aquellos reportados por otros

autores (Llano, 2007; Calado *et al.*, 2003; Rudolf *et al.* 2000; Hensirisak 1997; Parakulsuksatid 2000)

De acuerdo con el análisis estadístico, los mayores valores para los parámetros cinéticos de rendimiento y velocidad de crecimiento específica se presentaron a pH 5.5 y 200 RPM, combinación que al mismo tiempo mostró heterogeneidad con respecto a los otros grupos en la producción de biomasa. Esto puede deberse a la productividad del sistema y a que la energía de mantenimiento bajo estas condiciones es menor que la requerida a las mejores condiciones.

La levadura tuvo un buen aprovechamiento de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, ya que al final de la fermentación este se redujo en un 70 % de la concentración inicial de azúcares totales. Este consumo de sustrato es utilizado por la célula para suplir sus necesidades de crecimiento, formación de productos y mantenimiento.

El proceso de producción de biomasa de *Saccharomyces* spp. generó una disminución en el pH, debido a que este está estrechamente relacionado con el consumo de la fuente de carbono y de nitrógeno.

La técnica de escalamiento utilizado desde frascos agitados hasta biorreactor es útil para dar una orientación acerca de las condiciones que deben utilizarse en la siguiente escala, sin embargo, los resultados no fueron totalmente satisfactorios ya que se obtuvo una concentración significativamente menor (P - valor < 0.05) a nivel de biorreactor (18,6 g/L) en comparación a la obtenida a en frascos agitados (19,9 g/L). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el k_La es una herramienta útil para garantizar que el cambio de escala no afecte significativamente la función objetivo del proceso de escalamiento.

La fermentación llevada a cabo en el biorreactor a pH 4, 200 RPM, 28 °C y 1 vvm, permitió obtener una biomasa y un rendimiento de sustrato en biomasa estadísticamente igual a la obtenida a nivel de frascos agitados (P- valor > 0.05)

De acuerdo con lo reportado por Frick *et al.*, (2005) y a los valores arrojados para la velocidad específica de crecimiento, todas las fermentaciones presentaron metabolismo principalmente respirativo (aerobio), aunque se pudo haber presentado una mínima producción de etanol, tanto en frascos agitados como en el biorreactor,

Fue posible determinar las condiciones necesarias para realizar una producción de las levaduras nativas *Saccharomyces* spp. a un volumen de 100 L utilizando el coeficiente de transferencia de oxígeno, k_La , como parámetro de escalamiento, encontrado a partir del valor del k_La experimental y las correlaciones reportadas por Van't Riet (1979).

6. RECOMENDACIONES

Formular un medio de cultivo que permita obtener la misma cantidad de biomasa a partir de subproductos industriales que sean más económicos, ya que si se pretende realizar una producción industrial de los microorganismos estudiados sería necesario incurrir en altos costos debidos a que la formulación del medio requiere compuestos grado reactivo.

Evaluar mayores velocidades de agitación a nivel de biorreactor, para determinar el efecto de esta variable en el mezclado, transferencia de oxígeno del sistema y en la producción de biomasa.

Evaluar diferentes temperaturas, para observar la respuesta del sistema ante la alteración de esta variable, para obtener el mejor valor en el que se genere la mayor cantidad de biomasa.

Realizar fermentaciones en las cuales se controle el pH en un valor contante, para determinar si esto influye significativamente en la producción de biomasa.

Evaluar un sistema de producción fed batch para determinar si al controlar la concentración del nutriente limitante que para el caso es principalmente la fuente de carbono, es posible obtener una cantidad de biomasa mucho mayor al final de la fermentación.

Llevar a cabo un diseño conceptual del proceso de producción y un estudio de factibilidad técnico – económico del proyecto.

BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, K. L., NAGARAJA, T. G. y MORRILL, J. L.. (1987). Ruminant metabolic development in calves weaned conventionally or early. EN: Journal of Dairy Science. Vol. 70, N° 5 (May. 1987); p. 1000-1005.

ARAMBEL, M. J., y KENT, A.. (1990). Effect of Yeast Culture on Nutrient Digestibility and Milk Yield Response in Early- to Midlactation Dairy Cows. EN: Journal of Dairy Science. Vol. 73; p. 1560-1563.

ASENJO, J. (1995). Bacterial, Yeast, and Fungal Cultures, Scale-Up. En: Biorreactor System Design. U.S.A. Marcel Dekker, inc.

BAILEY, J. E.. (1986): Biochemical Engineering Fundamentals. Segunda edicion. McGraw Hill. New York

BALL, A. J. S., BRUVER, R. M., y TUSTANOFF, E. R.. (1975). Aerobic adaptation in yeast, IV: Alterations in enzyme synthesis during anaerobic-aerobic transitions in exponentially growing cultures. EN: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 21, N° 6 (Jun. 1975); p. 869-876.

BARFORD, J. P.. (1990). A general model for aerobic yeast growth; Batch growth. EN: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 35, N° 9 (Feb. 2004); p. 907-920.

BARRERA, Mónica. (2004). Diseño y escalamiento de un reactor biológico para la producción de microorganismos probióticos en un medio de cultivo no lácteo. Tesis (Ingeniera Química). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 110 p.

BECK, C., y MEYENBURG, H. K.. (1968). Enzyme pattern and aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation. EN: Journal of bacteriology. Vol. 96; N° 2; p. 476-486.

BEHARKA, A. A., *et al.* (1998). Effects of Form of the Diet on Anatomical, Microbial and Fermentative Development of the Rumen of Neonatal Calves. EN: Journal of Dairy Science. Vol. 81, N° 7 (Feb. 1998); p. 1946-1955.

BRUVER, R. M., BALL, A. J. S., y TUSTANOFF, E.R.. (1975a). Aerobic adaptation in yeast, I. Changes in metabolic intermediates during a step-down anaerobic-aerobic transfer. EN: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 21, N° 6 (Jun. 1975); p. 846-854.

BRUVER, R. M., BALL, A. J. S., y TUSTANOFF, E.R. (1975b). Aerobic adaptation in yeast III. Changes in metabolic intermediates during anaerobic-aerobic transitions in exponentially growing cultures. EN: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 21, N° 6 (Jun. 1975); p. 862-868.

BRYANT, M. P., y BURKEY L. A.. (1953). Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. EN: Journal of Dairy Science. Vol. 36; p. 205-217.

CALADO, C.R., *et al.*. (2003). Development of a fed-batch cultivation strategy for the enhanced production and secretion of cutinase by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. EN: Journal of bioscience and bioengineering. Vol. 96; N° 2; p. 141-148.

CNMA-CHILE. Comisión Nacional del Medio Ambiente-Región Metropolitana (1998). Guía para el control y prevención de la contaminación industrial: Fabricación de Levaduras. Santiago. 57 p.

DAVIS, Carl. (1993). Alimentación de la vaca lechera alta productora. Primera edición. Illinois: Impresa y publicada por Milk Specialties Company. 60 p.

DUARTE, Alberto. (1998). Introducción a la ingeniería Bioquímica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 529 p.

DORAN, P. (1999). Fluid flow and Mixing. En: Bioprocess engineering Principles. London. Academia Press Limited. p. 139.

FELDMANN, Horst. (2005). Yeast Molecular Biology: A short compendium on basic features and novel aspects. Munich: University of Munich. Adolf Butenandt Institute.

FURUKAWA, K., E. HEINZLE, y L. J. DUNN. (1983). Influence of oxygen on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2293-2317.

FRICK, O., Y WITTMANN, C.. (2005). characterization of metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ^{13}C flux analysis. Microbial cell factories.

GARCÍA, Eliel. (2004). Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in vitro*. Tesis (Doctor). Barcelona: Departamento de ciencia Animal i dels Aliments de la Universidad Autònoma de Barcelona. 146 p.

GOMEZ, Camila. (2003). Aproximación al escalamiento para la producción de *Bacillus sphaericus*: Obtención de un medio de cultivo para la producción industrial. Tesis (Ingeniera Química). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 83 p.

GUILLIERMOND, A. (1920). The yeast. New York: John Wiley and Sons Inc. 442 p.

HENSIRISAK, Patcharee. (1997). Scale-up the use of a microbubble dispersion to increase oxygen transfer in aerobic fermentation of baker's yeast. Tesis (Master de Ciencias en Ingeniería de Sistemas Biológicos). Blacksburg, Virginia: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Chemical Engineering. 97 p.

HOEK, P.; DIJKEN, J. Y PRONK, J.. (1998). Effect of specific growth rate n fermentative capacity of baker's yeast. EN: Applied and environmental microbiology. Vol. 64; N° 11; p. 4226-4233.

JARAMILLO, V., Y MILLÁN, A. P.. (2005). Estudio de diferentes parámetros para la optimización del crecimiento de *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*, como organismos probióticos, en un medio no láctico. Proyecto de grado (Ingeniero Químico). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 193 p.

JIMÉNEZ, Isabel y ROJAS, Carolina. (2003). Escalamiento para la producción de un biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* en fermentadores de 14 y 250L con base en la transferencia de oxígeno. Tesis (Ingeniera Química). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 130 p.

KAMALAMMA, KRISHNAMOORTHY, U. y KRISHNAPPA, P. (1996). Effect of feeding yeast culture (Yea-sacc 1026) on rumen in vitro and production performance in crossbred dairy cows. Animal feed Science and Technology. Vol. 57, N° 3; p. 247-256 p.

LEE, S.S., *et al.* (2004). In vitro stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. EN: Animal feed Science and Technology. Vol. 115, N° 3-4 (May. 2004); p. 215-226.

LIVENSE, J. C., y LIM, H. C.. (1982). The growth and dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in Annual reports on fermentation processes (G. T. Tsao).

LLANO, A. L. (2007). Escalamiento del proceso de producción de un insecticida biológico a nivel piloto para la empresa Productos Naturales de la Sabana S.A., ALQUERÍA. Proyecto de grado (Ingeniero de Procesos). Medellín: Universidad EAFIT. Departamento de Ingeniería de Procesos.

LYNCH, H. A. y MARTIN, S. A.. (2002). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. EN: Journal of Dairy Science. Vol. 85, N° 10 (Abr. 2002); p. 2603-2608.

MADIGAN, Michael; MARTINKO, John y PARKER, Jack. (1999). Brock: Biología de los microorganismos. Octava edición. Madrid: Prentie Hall Iberia. 1064 p.

MANOVACÍA, N. P. y MORENO, A. M. (2005). Selección de cepas de levadura con características probióticos y prebióticas para ser usadas como aditivo en nutrición animal. Trabajo de Grado (Ingeniero químico). Bogotá: Universidad de América. Facultad de ingeniería química.

MAIER, U. Y BUCHS, J.. (2001). Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking biorreactors. EN: Biochemical engineering journal 7. p. 99-106.

MAYORGA, Olga. (2002). Estudio y caracterización del complejo de enzimas degradadoras de la pared celular producidas por el hongo anaeróbico ruminal *Neocallimastix frontalis*. Tesis. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.

MILLER, G.. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagents for determination of reducing sugar. Analysis Chemical. 31: 26.31.

MILLER, T. *et al.* (2002). Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. EN: American Dairy Association. Vol. 85, N° 8 (Feb. 2002); p. 2009-2014.

MOJICA, Jorge. (1993). Estandarización de método “roll tube” para el conteo y aislamiento de bacterias anaeróbicas ruminales. Tesis (Medico Veterinario). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

NAGARAJA, T.G., NEWBOLD, C.J., VAN NEVEL, C.J. y DEMEYER, D.I. (1997). Manipulation of ruminal fermentation. EN: The rumen microbial ecosystem. New York: Ed Hobson, P. N. and Stewart; p 588-593.

ORLOWSKI, J. H., y BARFORD, J. P.. (1987). The mechanism of uptake of multiple sugars by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture under fully aerobic conditions. EN: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 25, N°5 (Feb, 1987); p. 459-463.

ORPIN, C. G. y JOBLIN, K. N.. (1997). The Rumen Anaerobic Fungi. EN: The rumen microbial ecosystem. London: Ed. Hobson, P. N.

PARAKULSUKSATID, Pramuk. (2000). Utilization of a microbubble dispersion to increase oxygen transfer in pilot-scale baker's yeast fermentation unit. Tesis (Master of science in biological system engineering). Blacksburg, Virginia: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. 108p.

PARRA, M. E.. (2004). Diseño y escalamiento de un reactor biológico para la producción de microorganismos probióticos en un medio de cultivo no lácteo. Tesis de grado (ingeniera química). Bogotá: Universidad de los Andes. Facultad de ingeniería química.

PIRT, S. J. (1965). The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proc. R. Soc. London Ser. B 163:224-231.

QUINTERO, Rodolfo. (1981). Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. 332 p.

RAMIREZ, Gabriel y PEDROZA, Julián. (2001). Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C en e biorreactor BioFlo 3000 M1227 y estudios inicial de fermentaciones en sistema continuo. Proyecto de Grado (Ingeniero de Producción Agroindustrial). Bogotá: Universidad de la Sabana. Facultad de Ingeniería de Producción Agroindustrial. 106 p.

REID, Gregor *et al.* (1990). Is there a role for *Lactobacilli* in prevention of urogenital and intestinal infection?. EN: Clinical Microbiology Reviews. Vol. 3, N°. 4 (Oct. 1990); p 335-344.

RUDOLF, A., Y FREDRIKSSON, J.. (2000). Probing control of glucose feeding in *Saccharomyces cerevisiae* cultivations. Department of chemical engineering II, Lund University.

RUSFTON, J.H, COSTICH, E.W y EVERETT, H.J. (1950). Power characteristics of mixing impellers. Parts I and II. Chem. Eng. Prog. 46, 395 - 404, 467-467. En: Fluid flow and Mixing. London. Academia Press Limited. p. 139.

SAFRIET, Dallas (1994). EPA document For U.S. Environmental Protection Agency Office of Air Quality Planning and Standards Emission Inventory Branch. Emission Factor Documentation for AP-42 Section 9.13.4: Yeast Production. United States.

SÁNCHEZ, Ronald. (2003). Optimización de la operación de biorreactores en el proceso de fermentación biológica. Tesis (Magíster en Ingeniería Mecánica). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Mecánica. 110 p.

SCRAGG, A. H.. (1991). Aerobic batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* using 2% glucose as a carbon source in Bioreactors in Biotechnology: a practical approach. England: Ellis Horwood Limited

SEN, Ramkrishna y BABU, Srinivasa. (2005). Modeling and optimization of the process conditions for biomass production and sporulation of a probiotic culture. EN: Process Biochemistry. Vol. 40, N°. 7 (Jun. 2005); p 2531- 2538.

SEPÚLVEDA, Paul. (2005). Evaluación de la velocidad de dilución en un proceso de fermentación continuo de *Escherichia coli* recombinante productora de α -amilasa. Proyecto de grado (Ingeniero Químico). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 111p.

SHULER, M.; KARGI, F. (1992). Bioprocess engineering: Basics concepts. New Jersey, USA. Editorial Prentice Hall.

SHULER, M. (2001). Bioprocess Engineering, Basic Concepts. 2a ed. U.S.A. Prentice Hall.

SLONIMSKI, P. P.. (1953). Adaptation in microorganisms. EN: Third Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press.

SOTO, Mery. (2004). Estudio de la producción de biomasa en un cultivo de *Bacillus thuringiensis* subesp *kurstaki* por medio de una metodología de alimentación fed-batch continua. Tesis (Ingeniera Químico). Bogotá: Universidad de los Andes. Departamento de Ingeniería Química. 88 p.

STRITTMATTER, C. F.. (1957). Adaptative variation in the level of oxidative activity in *Saccharomyces cerevisiae*. EN: Journal of general microbiology.

TUSTANOFF, E. R., y BARTLEY, W.. (1964). The effect of glucose on the development of respiration by an aerobically grown yeast. EN: Canadian Journal of Biochemistry.

UNAL-COLOMBIA, BOGOTA. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA – UNAL (2006). Curso internacional producción de biofertilizantes: desde laboratorio hasta su aplicación en campo.

VANT'RIET, K. (1979) Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev. 18, 357 – 364

VERDUYN, C., *et al.* (1991). A theoretical evaluation of growth yields of yeast. *Antonie Leeuwenhoek* 59:49-63.

VICENTE, A., *et al.* (1997). On-line estimation of biomass through pH control analysis in aerobic yeast fermentation systems. *EN: Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 58; N° 4; p. 445-450.

VILLEGAS, V.. (2006). Manual de prácticas de Laboratorio: Procesos de Biotransformación. Medellín: Universidad EAFIT. Departamento de Ingeniería de Procesos.

CIBERGRAFÍA

ALLTECH: Alltech's Animal Nutrition Division. [Disponible en Internet]. <http://www.alltech.com/About/feedDivision.cfm>. [Consulta: Febrero 2006].

ARCOS y DÍAZ. (2004). Degradabilidad *in vitro* de la pared celular de *Bouteloua repens* en líquido ruminal enriquecido con inóculos prototipo de bacterias y hongos celulolíticos aislados de bovinos en pastoreo en el trópico Colombiano. [Artículo en Internet]. <http://www.aida-itea.org/>. [Consulta: Marzo 2006].

BACH, A. *et al.* (2004). Efectos de la suplementación de levaduras vivas sobre el pH ruminal de vacas lecheras en estabulación libre. [Artículo en Internet]. <http://www.aida-itea.org/>. [Consulta: Marzo 2006].

DIAMOND V: Products. [Disponible en Internet]. <http://www.diamondv.com/products/index.html>. [Consulta: Febrero 2006].

GALE, W. F: (2001). Growth curve. [Disponible en Internet]. http://www.eng.auburn.edu/~wfgale/usda_course/pasteur_page1.htm). [Consulta: Febrero 2006].

GARCÍA, Andrés *et al.* (2004). Efecto de la inclusión de cultivo de levaduras “DIAMONDV XP®” en dietas para ganado lechero. México. [Artículo en Internet]. http://www.diamondvmex.com.mx/infotecnica/reportefinaldv_itesm.pdf. [Consulta: Marzo 2006].

GLUCOS INTERNACIONAL: Levadura *S. cerevisiae*. [Artículo en Internet]. <http://www.glucosinternacional.com/es/levedura/levedura>. [Consulta: Febrero 2006].

HONGOS ALERGENICOS: Taxonomía de *S. cerevisiae*. [Artículo en Internet]. <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/039.PDF>. [Consulta: Marzo 2006].

LALLEMAND: Products. [Disponible en Internet]. <http://www.lallemand.com/ANAH/eng/tabprobio.shtm>. [Consulta: Febrero 2006].

SALAZAR, José R.. (2004). Uso del cultivo de levaduras diamond V XP. [Artículo en Internet]. <http://www.diamondvmex.com.mx/infotecnica/bovinodepastoreo.pdf>. [Consulta: Marzo 2006].

ANEXOS

ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE BIOMASA (PESO SECO VS. DENSIDAD ÓPTICA) Y DETERMINACION DE BIOMASA

1. Después de realizar una fermentación completa del microorganismo se toma 1mL por duplicado de una muestra en la fase de crecimiento estacionaria (a las 12 horas del cultivo). Esta muestra se centrifuga en tubos eppendorf a 14000 RPM y 4 °C durante 20 minutos, se decanta el sobrenadante se lava 2 veces, recentrifuga y decanta de nuevo. El pellet se resuspende en 1 mL de agua desionizada y se lee absorbancia a 600 nm.
2. Se realizan las diluciones necesarias para obtener concentraciones conocidas mediante la ecuación:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad (11)$$

Donde:

C_1 : Concentración al final de la fermentación, que se tiene como absorbancia

V_1 : Volumen a tomar

C_2 : Concentración a la que se quiere llegar

V_2 : Volumen total correspondiente a la C_2 (5 mL)

3. Se lee la absorbancia de cada muestra a 600 nm, con agua desionizada como blanco.
4. En un eppendorf previamente secado, rotulado y pesado, se toma 1 mL de las muestras leídas, se centrifugan a las mismas condiciones descritas en el numeral 1, se descarta el sobrenadante y se llevan a un horno a 50 °C durante 24 h.

5. Se dejan enfriar en el desecador y se pesan hasta peso constante
6. La cantidad de biomasa se calcula mediante la ecuación 12.

$$C_x = \frac{X_2 - X_1}{V_L} \quad (12)$$

Donde:

C_x : Concentración de la biomasa seca [g/L].

X_1 : Peso de los eppendorf vacios y secos [g]

X_2 : Peso de los eppendorf con biomasa seca o pellet [g]

V_L : Volumen del cultivo [L]

7. Se realiza una grafica peso seco Vs. absorbancia y se linealiza.

DETERMINACIÓN DE BIOMASA

1. Se toma por duplicado 1 mL de la muestra y se introduce en un tubo falcon de 15 mL.
2. Se llevan a centrifugación durante 20 minutos a 4500 RPM.
3. El sobrenadante es conservado para realizar las pruebas de consumo de sustrato y el pellet es resuspendido en 1mL de agua desionizada.
4. Posteriormente se repite el lavado de las células como se indica en el numeral 2 y 3 descartando el sobrenadante.
5. Al terminar el segundo lavado, se descarta el sobrenadante y se realiza una dilución agregando al pellet 10 mL de agua desionizada.
6. Se lee la absorbancia a 600 nm, con agua desionizada como blanco. Estos valores se relacionan con el peso seco mediante una curva de calibración. Para obtener la concentración final debe multiplicarse por el factor de dilución.

ANEXO B. PREPARACIÓN DEL DNS, CURVA DE CALIBRACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL DNS

Pasos para preparar DNS:

1. Disolver 1.6 g de NaOH en H₂O destilada.
2. Adicionar 30 g de tartrato de Na y K
3. Adicionar 1 g de DNS
4. Aforar a 100 mL con H₂O destilada
5. Almacenar en frascos ámbar a 4 °C

Se debe mantener un stock de glucosa 4 mg/mL y almacenarlo a 4 °C.

A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/L): 0.25, 0.5, 1, 2 y 4.

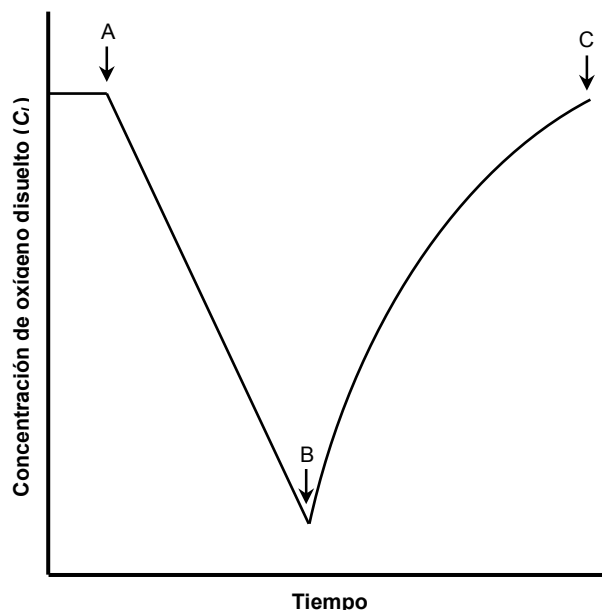
DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL DNS

1. Tomar 0.5 mL de cada dilución y agregar 0.5 mL de reactivo DNS.
2. Preparar una muestra blanco por dilución de 0.5 mL de H₂O destilada a 0.5 mL del reactivo de DNS.
3. Agitar todas las muestras.
4. Colocar a ebullición las muestras en baño maría por 5 minutos.
5. Enfriar con hielo.
6. Adicionar 5 mL de H₂O destilada.
7. Agitar y dejar en reposo 15 min.
8. Leer a 540 nm.
9. Realizar la curva Absorbancia versus concentración. Debe tener un coeficiente de correlación de 0.991 a 0.999.

ANEXO C. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO POR EL MÉTODO DINÁMICO DE ELIMINACIÓN DE GAS

El procedimiento consiste en suspender la aireación del reactor, lo cual resulta en un decaimiento lineal de la concentración de oxígeno disuelto debido a la respiración del cultivo. Luego se reanuda la aireación y la concentración de oxígeno disuelto aumenta para alcanzar el valor inicial, de acuerdo como se ilustra en la figura 6 (Sepúlveda, 2005).

Figura 20. Relación entre la concentración de oxígeno disuelto y el tiempo para el método dinámico de eliminación de gas para la determinación de $k_L a$. La aireación se suspende en el punto A y se reanuda en el punto B.



Fuente: Sepúlveda, 2005.

En el punto B el aire suministrado al cultivo aumenta la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo y C es el punto donde es posible que la

concentración de oxígeno disuelto alcance rápidamente el equilibrio, por esto es necesario asumir que la aireación es lo suficientemente rápida para que no genere un efecto en el crecimiento celular. La pendiente de la línea AB es una medida de la tasa de respiración del cultivo; y el aumento de la concentración de oxígeno disuelto en el periodo BC es la diferencia entre la transferencia de oxígeno a la solución y la toma del oxígeno disuelto por las células, que se puede describir mediante la ecuación 13 (Parakulsuksatid, 2000; Sepúlveda, 2005).

$$\frac{dC}{dt} = K_L a(C^* - C) - xQ_{O_2} \quad (13)$$

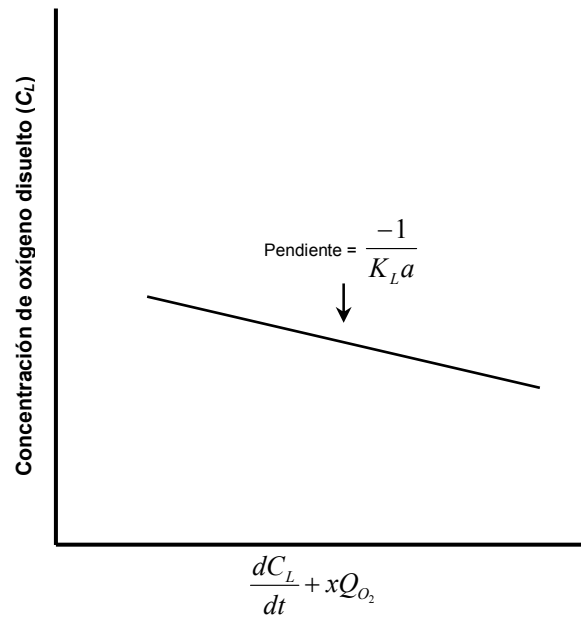
Donde: x [células/ mL] es la concentración de biomasa y Q_{O_2} [mmolO₂/g células.h] es la demanda específica de oxígeno (tasa específica de respiración). El término xQ_{O_2} es equivalente a la pendiente de la línea AB de la figura 6 (Sepúlveda, 2005).

Despejando el término C (concentración de aire disuelto en el seno del fluido) de la ecuación 13 se obtiene (Sepúlveda, 2005):

$$C = -\frac{1}{K_L a} \left(\frac{dC}{dt} + xQ_{O_2} \right) + C^* \quad (14)$$

De la ecuación anterior, es posible graficar C Vs. $(dC/dt + xQ_{O_2})$ que generara una línea recta con pendiente $-1/k_L a$ y pendiente C^* (Sepúlveda, 2005).

Figura 21. Método dinámico para la eliminación de gas para la determinación de $k_L a$.



Fuente: Sepúlveda, 2005.

La ventaja de este método es la facilidad para determinar el valor de $k_L a$ midiendo la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo. Sin embargo también conlleva algunas desventajas, como cuando el suministro de aire se suspende, debido a que la concentración de oxígeno en el punto B se acerca a la concentración crítica de oxígeno disuelto (C_{crit}), lo que puede favorecer el metabolismo anaeróbico en lugar del metabolismo aeróbico, además, el método requiere una prueba de oxígeno con un tiempo de respuesta rápido porque de lo contrario el resultado puede ser menos preciso (Parakulsuksatid, 2000).

Procedimiento

1. Suspender la aireación al reactor y tomar los valores de tensión de oxígeno disuelto (TOD) cada 30 segundos hasta que este llegue al punto crítico
2. Reanudar la aireación al reactor y tomar los valores de tensión de oxígeno disuelto (TOD) cada 10 segundos hasta que este alcance el valor inicial
3. Graficar TOD Vs. tiempo para los valores tomados en el paso 1 (grafica 1)

4. Determinar la pendiente de la grafica 1 que es equivalente a la tasa de respiración el cultivo (xQ_{O_2})
5. Graficar TOD Vs. $dTOD/dt + xQ_{O_2}$ para los valores tomados en el paso 2 (grafica 2)
6. Determinar la pendiente de la grafica 2 que es equivalente a $-1/k_L a$

ANEXO D. FERMENTACIONES PRELIMINARES.

Estas fermentaciones se llevaron a cabo para determinar el tiempo de cultivo y el mejor medio de cultivo en el que se presento un mayor crecimiento celular de las levaduras nativas *Saccharomyces* spp.

Tabla 16. Curvas de crecimiento y consumo de sustrato con sus respectivos errores estándar para determinar el tiempo de cultivo

Tiempo (h)	Fermentación Preliminar 1				Fermentación Preliminar 2			
	Concentración Celular (g/l)	Error	Conc. Azúcares (g/l)	Error	Concentración Celular (g/l)	Error	Conc. Azúcares (g/l)	Error
0	0,578	0,003	44,841	0,031	0,466	0,003	41,841	0,009
2	1,213	0,002	45,878	0,014	1,351	0,003	41,659	0,028
4	2,518	0,016	44,768	0,010	3,437	0,008	37,780	0,018
6	5,901	0,013	37,744	0,030	6,948	0,033	32,841	0,006
8	13,207	0,005	27,171	0,010	13,413	0,006	21,963	0,001
10	16,091	0,007	15,146	0,016	15,525	0,007	13,329	0,004
12	16,357	0,008	11,963	0,038	15,980	0,001	7,268	0,044
14	17,284	0,013	10,354	0,007	16,168	0,001	5,902	0,001
16	17,310	0,003	9,963	0,011	16,632	0,011	5,732	0,003
18	17,439	0,038	10,000	0,002	17,954	0,053	5,463	0,002
20	17,748	0,007	10,256	0,003	19,645	0,045	4,439	0,002
22	17,559	0,012	10,476	0,007	20,839	0,025	5,232	0,018

Tabla 17. Determinación del mejor medio de cultivo para el crecimiento de la levadura nativa, *Saccharomyces* spp, con respecto a la producción de biomasa.

Medio de Cultivo	Concentración Final	
	Peso Seco (g/L)	Conteo en cámara (Células/mL)
YM Líquido	3,2651	1,04*10 ⁹
YM Líquido	4,2610	1,44*10 ⁹
YM Líquido	3,7459	8,80*10 ⁸
YM Modificado	4,3297	1,92*10 ⁹
YM Modificado	2,1834	1,12E*10 ⁹
YM Modificado	2,2865	1,12*10 ⁹
YM Mod + Melaza	9,6180	4,64*10 ⁹
YM Mod + Melaza	9,5150	4,08*10 ⁹
YM Mod + Melaza	9,8928	6,08*10 ⁹

Análisis estadístico

Tabla 18. Medias y error estándar para la biomasa determinada por el método del peso seco para tres medios de cultivo evaluados, con un intervalo de confianza del 95%.

Table of Means for Biomasa PS by Medio
with 95,0 percent Tukey HSD intervals

Medio	Count	Mean	Stnd. err (pooled
YM	3	3,75733	0,4411
YM Mod	3	2,9332	0,4411
YM Mod + M	3	9,67527	0,4411
Total	9	5,45527	

Tabla 19. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para los medios de cultivo evaluados

Multiple Range Tests for Biomasa PS by Medio

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls			
Medio	Count	Mean	Homogeneous Grc

YM Mod	3	2,9332	X
YM	3	3,75733	X
YM Mod + M	3	9,67527	X

Contrast			Difference

YM - YM Mod			0,824133
YM - YM Mod + M			*-5,91793
YM Mod - YM Mod + M			*-6,74207

* denotes a statistically significant difference.			

ANEXO E. FERMENTACIONES EN FRASCOS AGITADOS.

En esta etapa se determinaron las mejores condiciones de pH y agitación que produjeran la mayor cantidad de biomasa. Se reportaron las curvas que tuvieron un mejor comportamiento para cada ensayo.

Tabla 20. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y pHs con sus respectivos errores estándar e las fermentaciones realizadas en frascos agitados a 100 RPM.

Tiempo (h)	ENSAYO 1					ENSAYO 2					ENSAYO 3				
	PESO SECO		DNS		pH	PESO SECO		DNS		pH	PESO SECO		DNS		pH
	Conc. Celular (g/l)	E. St	Conc. Azúcare s (g/L)	E. St		Conc. Celular (g/l)	E. St	Conc. Azúcare s (g/L)	E. St		Conc. Celular (g/l)	E. St	Conc. Azúcare s (g/L)	E. St	
Medio	-0,4092	0,0010	33,7400	0,0174	4,11	-0,5638	0,0000	22,7225	0,0068	4,97	-0,7870	0,0000	22,7050	0,0347	5,59
0	1,3679	0,0075	31,2550	0,0079	4,11	1,3507	0,0045	24,5550	0,0237	4,92	0,9214	0,0005	27,0100	0,0254	5,48
2	2,5612	0,0010	34,7975	0,0233	4,10	2,3981	0,0025	28,7550	0,0041	4,88	1,8572	0,0070	32,3975	0,0103	5,41
4	5,2826	0,0045	37,7500	0,0820	4,06	5,4286	0,0060	31,1500	0,0061	4,81	4,8705	0,0125	33,6525	0,0027	5,28
6	10,6654	0,0010	26,9450	0,0437	3,97	11,2149	0,0080	25,9125	0,0076	4,68	10,4164	0,0045	26,3375	0,0162	5,09
8	17,2673	0,0075	14,0000	0,0133	3,87	16,4002	0,0120	12,1250	0,0007	4,56	15,4043	0,0030	14,0700	0,0057	4,94
10	19,7999	0,0250	3,6600	0,0016	3,89	18,2546	0,0000	6,7575	0,0431	4,59	17,9455	0,0210	4,8475	0,0012	4,99
12	20,1089	0,0080	3,7350	0,0013	3,90	20,1003	0,0075	5,0225	0,0015	4,59	19,3019	0,0100	4,2050	0,0013	4,99

Tabla 21. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y pHs con sus respectivos errores estándar e las fermentaciones realizadas en frascos agitados a 150 RPM.

Tiempo (h)	ENSAYO 1					ENSAYO 2					ENSAYO 3				
	PESO SECO		DNS		pH	PESO SECO		DNS		pH	PESO SECO		DNS		pH
	Conc. Celular (g/l)	E. St	Conc. Azúcare s (g/L)	E. St		Conc. Celular (g/l)	E. St	Conc. Azúcare s (g/L)	E. St		Conc. Celular (g/l)	E. St	Conc. Azúcare s (g/L)	E. St	
Medio	-0,4007	0,0005	41,6850	0,0637	4,09	-0,6668	0,0010	24,0600	0,0130	4,96	-0,2762	0,0000	25,6125	0,0041	4,98
0	1,7628	0,0045	44,1175	0,0153	4,09	1,5911	0,0025	30,7300	0,0057	4,90	1,4237	0,0005	30,2025	0,0390	4,93
2	2,9818	0,0095	41,8500	0,0027	4,08	2,6814	0,0010	32,0250	0,0537	4,87	2,2721	0,0000	38,5400	0,0924	4,89
4	7,1799	0,0080	35,8250	0,0421	4,12	7,1627	0,0050	33,5300	0,0665	4,84	5,2397	0,0030	30,0450	0,0740	4,79
6	12,3738	0,0175	29,3075	0,0238	4,03	13,1207	0,0250	24,0300	0,0154	4,69	11,9832	0,0025	21,9875	0,0069	4,64
8	18,3747	0,0340	8,3275	0,0112	3,91	18,2889	0,0010	6,3850	0,0034	4,60	16,9518	0,0100	6,9025	0,0053	4,64
10	19,3878	0,0450	4,6275	0,0044	3,96	18,9156	0,0035	3,9750	0,0007	4,62	18,4069	0,0035	6,8075	0,0175	4,65
12	20,6240	0,0010	4,4300	0,0097	3,94	19,5938	0,0070	3,9125	0,0018	4,65	19,1925	0,0035	5,8650	0,0010	4,69

Tabla 22. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y pHs con sus respectivos errores estándar e las fermentaciones realizadas en frascos agitados a 200 RPM.

Tiempo (h)	ENSAYO 1					ENSAYO 2					ENSAYO 3				
	PESO SECO		DNS		pH	PESO SECO		DNS		pH	PESO SECO		DNS		pH
	Conc. Celular (g/l)	E. St	Conc. Azúcare s (g/L)	E. St		Conc. Celular (g/l)	E. St	Conc. Azúcare s (g/L)	E. St		Conc. Celular (g/l)	E. St	Conc. Azúcare s (g/L)	E. St	
Medio	-0,3148	0,0025	47,4275	0,0381	4,12	-0,1388	0,0000	31,1275	0,0003	4,99	-0,3191	0,0005	28,1275	0,0043	5,54
0	1,7714	0,0000	44,1175	0,0153	4,13	1,5782	0,0005	36,9100	0,0023	4,96	1,5267	0,0015	33,0275	0,0037	5,47
2	2,6642	0,0000	43,1175	0,0032	4,24	2,3322	0,0005	39,0800	0,0088	4,92	2,2550	0,0050	36,0750	0,0195	5,36
4	5,2569	0,0100	40,8175	0,0583	4,08	5,4028	0,0035	40,0100	0,0084	4,80	4,8019	0,0005	38,2450	0,0041	5,19
6	10,1503	0,0180	31,6875	0,0004	4,06	11,3050	0,0020	29,7675	0,0570	4,66	11,4080	0,0020	32,3675	0,0066	4,93
8	17,4304	0,0190	14,1025	0,0024	3,85	17,1922	0,0150	9,0250	0,0095	4,59	16,9174	0,0060	11,0975	0,0023	4,84
10	19,7054	0,0025	6,6975	0,0004	3,88	19,0079	0,0075	7,0175	0,0128	4,61	18,5786	0,0165	8,2075	0,0036	4,84
12	19,9286	0,0035	6,4225	0,0013	3,88	19,4929	0,0130	7,4225	0,0053	4,65	18,7890	0,0210	6,5275	0,0008	4,89

Análisis estadístico

Tabla 23. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para la biomasa con respecto al pH.

Multiple Range Tests for Biomasa by pH

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

pH	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous G
5,5	9	18,1034	0,206375	X
5	9	18,8231	0,206375	X
4	9	19,187	0,206375	X

Contrast	Difference
4 - 5	0,3639
4 - 5,5	*1,0836
5 - 5,5	*0,7197

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 24. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para la biomasa con respecto a las revoluciones.

Multiple Range Tests for Biomasa by RPM

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

RPM	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous G
100	9	18,4778	0,206375	X
150	9	18,814	0,206375	X
200	9	18,8216	0,206375	X

Contrast	Difference
100 - 150	-0,336256
100 - 200	-0,343878
150 - 200	-0,00762222

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO F. PARÁMETROS CINÉTICOS.

Tabla 25. Rendimiento observado y máxima velocidad de crecimiento específica para las fermentaciones que presentaron la mayor producción de biomasa en cada ensayo.

pH	RPM	$Y'_{x/s}$			μ_{max}		
		100 RPM	150 RPM	200 RPM	100 RPM	150 RPM	200 RPM
4		0,3870	0,3100	0,4160	0,2850	0,2800	0,3220
4		0,3530	0,3890	0,5350	0,3070	0,3380	0,3310
4		0,5310	0,4370	0,4630	0,3210	0,2960	0,3140
5		0,4520	0,3790	0,4820	0,3190	0,2940	0,3360
5		0,5420	0,5130	0,4840	0,3140	0,3370	0,3370
5		0,6390	0,5230	0,6650	0,3240	0,3180	0,3410
5,5		0,4120	0,4210	0,4870	0,3170	0,2820	0,3280
5,5		0,4290	0,5050	0,4990	0,2940	0,3390	0,3450
5,5		0,5630	0,5810	0,6660	0,3550	0,3620	0,3630

Análisis estadístico

Tabla 26. Medias y error estándar para la los rendimientos observados con un intervalo de confianza del 95%.

Table of Least Squares Means for Yxs with 95,0 Percent Confidence Intervals				
Level	Count	Mean	Std. Error	
GRAND MEAN	27	0,483815		
RPM				
100	9	0,478667	0,028576	
150	9	0,450889	0,028576	
200	9	0,521889	0,028576	
pH				
4	9	0,424556	0,028576	
5	9	0,519889	0,028576	
5,5	9	0,507	0,028576	
RPM by pH				
100 4	3	0,423667	0,049	
100 5	3	0,544333	0,049	
100 5,5	3	0,468	0,049	
150 4	3	0,378667	0,049	
150 5	3	0,471667	0,049	
150 5,5	3	0,502333	0,049	
200 4	3	0,471333	0,049	
200 5	3	0,543667	0,049	
200 5,5	3	0,550667	0,049	

Tabla 27. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para los rendimientos observados con respecto al pH.

Multiple Range Tests for Yxs by pH

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls				
pH	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous G
4	9	0,424556	0,0285767	X
5,5	9	0,507	0,0285767	X
5	9	0,519889	0,0285767	X
Contrast	Difference			
4 - 5	-0,0953333			
4 - 5,5	-0,0824444			
5 - 5,5	0,0128889			

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 28. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para los rendimientos observados con respecto a las revoluciones.

Multiple Range Tests for Yxs by RPM

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls				
RPM	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous G
150	9	0,450889	0,0285767	X
100	9	0,478667	0,0285767	X
200	9	0,521889	0,0285767	X
Contrast		Difference		
100 - 150		0,0277778		
100 - 200		-0,0432222		
150 - 200		-0,071		

* denotes a statistically significant difference.

Tabla 29. Medias y error estándar para la velocidad específica de crecimiento máxima μ_{\max} con un intervalo de confianza del 95%.

Table of Least Squares Means for u max
with 95,0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error
GRAND MEAN	27	0,322185	
RPM			
100	9	0,315111	0,007655
150	9	0,316222	0,007655
200	9	0,335222	0,007655
pH			
4	9	0,310444	0,007655
5	9	0,324444	0,007655
5,5	9	0,331667	0,007655
RPM by pH			
100 4	3	0,304333	0,0133
100 5	3	0,319	0,0133
100 5,5	3	0,322	0,0133
150 4	3	0,304667	0,0133
150 5	3	0,316333	0,0133
150 5,5	3	0,327667	0,0133
200 4	3	0,322333	0,0133
200 5	3	0,338	0,0133
200 5,5	3	0,345333	0,0133

Tabla 30. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para la velocidad específica de crecimiento máxima μ_{\max} con respecto al pH.

Multiple Range Tests for μ_{\max} by pH

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls				
pH	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous G
4	9	0,310444	0,00765539	X
5	9	0,324444	0,00765539	X
5,5	9	0,331667	0,00765539	X
Contrast			Difference	
4 - 5			-0,014	
4 - 5,5			-0,0212222	
5 - 5,5			-0,00722222	
* denotes a statistically significant difference.				

Tabla 31. Prueba de rango múltiple por el método de Student-Newman-Keuls para la velocidad específica de crecimiento máxima μ_{\max} con respecto a las revoluciones.

Multiple Range Tests for μ_{\max} by RPM

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls				
RPM	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Gr
100	9	0,315111	0,00765539	X
150	9	0,316222	0,00765539	X
200	9	0,335222	0,00765539	X
Contrast			Difference	
100 - 150			-0,00111111	
100 - 200			-0,0201111	
150 - 200			-0,019	
* denotes a statistically significant difference.				

ANEXO G. FERMENTACIONES EN BIORREACTOR

Se realizó un escalamiento de las condiciones halladas a nivel de frascos agitados en un biorreactor con volumen de trabajo de 2 L.

Tabla 32. Producción de biomasa, consumo de sustrato y comportamiento del pH en biorreactor con 2 L de volumen de trabajo, pH 4, 150 RPM, 1vvm y 28°C.

Tiempo (h)	Concentración celular (g/L)	Error	Concentración azúcar (g/L)	Error	pH
0	0,569450	0,00100	55,880	0,01860	4,17
2	1,522385	0,00050	46,713	0,02225	4,17
4	4,020620	0,00900	43,355	0,06050	4,15
6	6,853670	0,00700	37,355	0,04610	4,10
8	16,048205	0,00950	16,678	0,03325	3,97
10	18,452005	0,00950	6,638	0,00355	3,99
12	18,606535	0,00350	7,270	0,01970	4,00

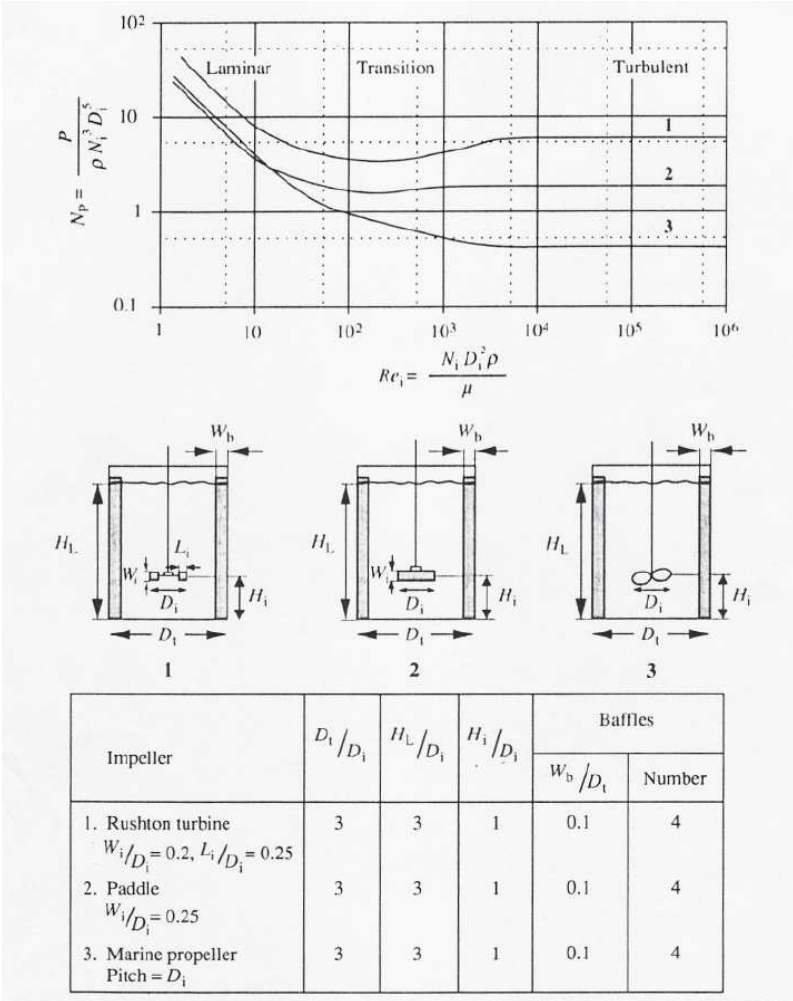
Tabla 33. Producción de biomasa, consumo de sustrato y comportamiento del pH en biorreactor con 2 L de volumen de trabajo, pH 4, 200 RPM, 1vvm y 28°C.

Tiempo (h)	Concentración celular (g/L)	Error	Concentración azúcar (g/L)	Error	pH
0	0,861340	0,00200	37,295	0,01030	4,06
2	1,908710	0,00100	38,950	0,01150	4,02
4	4,621570	0,00200	36,313	0,04045	3,99
6	10,339180	0,00400	23,838	0,01975	3,94
8	17,447560	0,00700	8,293	0,00645	3,90
10	19,293335	0,00550	6,348	0,01125	3,86
12	19,482205	0,01550	5,405	0,00260	3,89

ANEXO H. RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE REYNOLDS Y TRES TIPOS DE IMPULSORES.

Esta figura se utilizo en el escalamiento, para determinar el número de potencia. El gráfico se encuentra en el libro *Bioprocess Engineering Principles*.

Figura 22. Relación entre el número de Reynolds y tres tipos de impulsores.



Fuente: Rushton *et al.*, 1950